



HAL
open science

Taxonomie et biogéographie des mollusques d'eau douce patrimoniaux : quelles échelles pour la délimitation des taxons et des unités de gestion ?

Vincent Prié

► To cite this version:

Vincent Prié. Taxonomie et biogéographie des mollusques d'eau douce patrimoniaux : quelles échelles pour la délimitation des taxons et des unités de gestion ?. Systématique, phylogénie et taxonomie. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2013. Français. NNT : . tel-00994315

HAL Id: tel-00994315

<https://theses.hal.science/tel-00994315v1>

Submitted on 21 May 2014

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

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

MUSEUM NATIONAL



D'HISTOIRE NATURELLE

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

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□□□

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : Taxonomie et phylogéographie

Présentée et soutenue publiquement par

Vincent Prié

Le 19 décembre 2013

**Taxonomie et biogéographie des mollusques d'eau douce
patrimoniaux :
quelles échelles pour la délimitation des taxons et des
unités de gestion ?**

Sous la direction de : **Monsieur Bouchet, Philippe, Professeur**

JURY :

M. DOUADY, Christophe	(Université Claude-Bernard, CNRS, Lyon)	Président
M. BACKELJAU, Thierry	(Université d'Anvers & IRScNB, Bruxelles)	Rapporteur
M. ARAUJO, Rafael	(Museo nacional de Ciencias naturales, Madrid)	Rapporteur
M. PUILLANDRE, Nicolas	(Muséum national d'Histoire naturelle, Paris)	Examineur
M. SIBLET, Jean-Philippe	(Service du Patrimoine Naturel, Paris)	Examineur
M. BOUCHET, Philippe	(Muséum national d'Histoire naturelle, Paris)	Directeur de Thèse

*A mon pote Nico
qu'est parti trop tôt, un matin de juin,
alors que je commençais tout juste cette thèse*

Remerciements

J'adresse mes remerciements en premier lieu aux personnes qui m'ont le plus apporté pour la construction du cadre de l'ensemble de mon travail de thèse, à savoir Philippe Bouchet, Gilbert Cochet, Christophe Douady, Florian Malard, Pierre Marmonnier, Rafa Araujo et Thierry Backeljau. Philippe, en particulier, m'a apporté sa confiance depuis 2003, m'a accueilli au sein de l'équipe de malacologie continentale du Muséum et a su me laisser l'autonomie à laquelle j'aspire tout en restant réactif à mes sollicitations aux moments où j'ai eu vraiment besoin de son soutien. Je remercie également Frédéric Melki, Anne-Lise Ughetto, Jean-Yves Kernel et Claire Poinot qui m'ont aidé à mener ce travail à bien. Je remercie Dominique Higuët et Hervé Le Guyader pour leur investissement dans une étape préalable à ce travail. Je tiens à remercier également Annie Tillier et Marie-Catherine Boisselier-Dubayle qui m'ont soutenu dans des moments difficiles.

Un grand merci à Nicolas Puillandre qui a été très présent tout au long de ce travail de thèse, a su m'épauler efficacement, d'une manière très professionnelle et néanmoins très humaine. L'établissement d'une telle complicité n'allait pas de soi a priori, mais Philippe, encore une fois, a su déceler les potentialités de synergies au sein de ses collaborateurs.

Je remercie chaleureusement Benoit Fontaine qui a relu de multiples versions préliminaires d'articles et du manuscrit de thèse et m'a beaucoup aidé dans la réflexion et dans la rédaction ; ainsi que Marie-Lilith Patou, qui a toujours répondu à mes sollicitations et a été de bon conseil, bien qu'elle n'ait rien à voir avec ce sujet.

Danielle Merkiel, Madiha Abada, Mahjouba Fassa et Philippe Leballer m'ont aidé à surmonter les épreuves de l'administration. Merci également à Virginie Héros, Philippe Maestrati et Barbara Buges pour tous les coups de mains qu'ils ont pu me donner.

Merci à Hervé Jourde, Christelle Batiot, Bernard Ladouche et Henri Paloc pour leurs éclairages avisés sur les hydrosystèmes karstiques. Muito obrigado aos colegas portuguesas, Elsa Froufe y Manuel Lopes-Lima para tudo que partilhamos. Thanks also to Ian Killeen pour avoir relu et corrigé les manuscrits.

Nicoletta Riccardi, Antoine Wagner, Sylvain Vrignaud, Patrick Lemaô, Olivier Hesnard, Benoit Lecaplain, Pierre-Yves Pasco, Jose Mateï, Henri Persat, Michel Bramard, Alain Serena et Florent Lamand m'ont fourni des échantillons de bivalves. Patrick Abijou, Henri Beneditti et surtout Franck Vasseur m'ont accompagné ou m'ont fourni directement des prélèvements en plongée souterraine, parfois très engagée. Gérard Tardivo (DREAL Centre) et Stéphane Laine (Ministère de l'Environnement) ont soutenu ma demande d'autorisation de capture d'espèces protégées. Merci également à Henri Girardi pour tous les échanges que nous avons pu avoir malgré un contexte diplomatique difficile.

Merci à Yvon, Aurélie, Ben et Gargo pour m'avoir hébergé sur Paris. Merci à Fred Pruneau, qui saura pourquoi.

Je n'oublie pas la petite équipe de malacologie continentale française : Olivier Gargo, Benoit Fontaine et Xavier (cucuch) Panier (et le Jean-Mich Malaco, qui a été catalyseur, mais à choisi d'autres voies). Que perdure notre fraîcheur, notre dynamisme, notre franche camaraderie et... en route pour de nouvelles aventures (on a encore la red list à faire) !

Enfin, un grand merci à tous mes partenaires de terrain, sans qui un tel jeu de données sur les bivalves de France n'aurait jamais vu le jour : Merci à mon fidèle Jacquouille, pour la logistique et toutes ces heures passées sous l'eau (et merci Marie-Saucisse de m'avoir fait rencontrer Jacquouille) ; que la galle et les bras courts s'éloignent de vos chemins. Merci à Lolo de m'avoir pas ramené de *mancus* de la Loire. Comme ça au moins, le mystère reste entier. J'oublie pas non plus l'anodonte pourrie d'Ouessant ni les *Unio* de l'Oise parfum vanille. Merci à Panier, élément central de la pêche aux moules (voir p. ex. www.youtube.com/watch?v=Tzn3ANmgl1s). Merci à Badam, chaman des eaux douces (oublies pas de me laisser une touffe de cheveux comme promis). Merci à disciple (oublies pas de me remercier aussi à l'occasion). Un grand merci à Gilbert. Ne m'en veut pas trop d'avoir avancé tout seul sur la fin, il paraît qu'il faut savoir tuer le père. Merci à Charlie Pichon, Nicolas Legrand, Damien Froment, Ludwick Simon, Nicolas Patry, Noëlie Tapko, Gwenaëlle Fahrner ainsi qu'Audrey Thonnel et Vincent Rufay (pour le souterrain). Merci Marine de m'avoir supporté, aidé, conseillé, soutenu pendant toute cette période. Je te promets d'essayer d'être plus dispo maintenant. Et puis toutes mes excuses à mes filles, Tifenn et Nolwenn, qui ont dû s'accommoder aussi de longues périodes d'indisponibilités. On va rattraper tout ça.



Ce travail a bénéficié du support financier de BIOTOPE (PI Frederic Melki), de l'ATM Barcode (PIs Sarah Samadi and Jean-Noël Labat), de l'ANR 6eme extinction (PI Philippe Bouchet) et de la DREAL Languedoc-Roussillon (PIs Capucine Crosnier, Valentin LeTellier & Jacques Regad).

SOMMAIRE

INTRODUCTION	9
Contexte professionnel	9
Contexte économique	10
Contexte réglementaire	12
Objectifs généraux de la thèse	14
PARTIE I : GENERALITES, PRESENTATION DES MODELES ET METHODES.....	17
I.1 Nommer et classer les espèces	18
I.1.1 Nomenclature et concept de l'espèce.....	18
I.1.1.1 La nomenclature binomiale et le Code	18
I.1.1.2 Matériel et station type.....	18
I.1.1.3 Espèce taxonomique vs espèce nominale.....	19
I.1.1.4 Délimitation de l'espèce aujourd'hui	19
I.1.2 Checklists : la stabilité en sursis des noms d'espèce	20
I.1.3 Des noms pour communiquer : de l'importance du vernaculaire	38
I.2 Historique et mécanismes de la conservation	48
I.2.1 La crise de la biodiversité – prise de conscience et historique des actions de conservation	48
I.2.1.1 Du constat.....	48
I.2.1.2 ... aux actes	49
I.2.1.3 La protection de la biodiversité pour elle-même	50
I.2.1.4 Les fonctionnalités : un agenda optimiste pour le XXI ^e siècle ?	51
I.2.2 Mécanismes, paradoxes et biais de la conservation	53
I.2.2.1 Les espèces charismatiques	53
I.2.2.2 Geopolitical Species Concept : quand la conservation réinvestit la taxonomie	57
I.2.2.3 Objectiver et hiérarchiser les enjeux. Limites et perspectives des listes rouges	58
I.2.3 Place de la taxonomie dans la conservation	59
I.3 Présentation des modèles	60
I.3.1 Les naïades	60
I.3.1.1 Taxons.....	60
I.3.1.2 Histoire naturelle.....	60
I.3.1.3 La dispersion.....	60
I.3.1.4 Des perles et des boutons	62
I.3.1.5 La simplification taxonomique	64
I.3.2 Gastéropodes stygobies	64
I.3.2.1 Taxonomie.....	64

I.3.2.2	Histoires naturelles.....	64
I.3.2.3	Dispersion.....	65
I.3.2.4	De l'eau au robinet - qualité et quantité.....	65
I.3.2.5	L'inflation taxonomique	66
I.4	Méthodes d'investigation et d'analyses.....	67
I.4.1	Périmètre d'étude et sites échantillonnés	67
1.4.2	Méthodes d'échantillonnage.....	69
I.4.2.1	Rivières	69
I.4.2.2	Réseaux souterrains	72
1.4.3	Morphométrie des coquilles	74
I.4.3.1	Gastéropodes stygobies	74
I.4.3.2	Naïades.....	75
1.4.4	Analyses moléculaires	76
I.4.4.1	Prélèvements de tissus.....	76
I.4.4.2	Extractions, amplifications, séquençage	77
I.4.5	Mise en œuvre opérationnelle.....	77
1.4.5.1	Prestataires.....	78
1.4.5.2	Taux de succès des deux prestataires	78
I.4.6	Plan de la thèse	81
PARTIE II	: NAIADES	83
II.1	Phylogéographie et diversité génétique	84
II.1.1	Barcoding chez <i>U. mancus</i> et <i>U. pictorum</i>	84
II.1.2	Structuration génétique de <i>Potomida littoralis</i> en Europe (COI & 16S)	103
II.1.3	Structuration génétique chez les populations isolées de <i>M. margaritifera</i> en France.....	142
II.1.4	Structuration génétique du genre <i>Unio</i> en Europe (COI, 16S, 28S)	149
II.1.5	La Doubly Uniparental Inheritance : une singularité de l'hérédité de quelques groupes de bivalves, dont le genre <i>Unio</i>	167
II.2	Essai d'analyse morphométrique	169
II.2.1	Illustration de la variabilité morphologique.....	169
II.2.2	Test de la distinction des 2 clades moléculaires d' <i>Unio crassus</i> par une approche morphométrique et biométrique.....	186
II.2.2.1	La difficile biométrie des coquilles de bivalves	186
II.2.2.2	Résultats des transformées de Fourier	189
II.2.2.3	Conclusion	191
II.3	Quel déterminisme de la distribution des taxons ?	192

Rappel des principaux résultats de la partie II	207
PARTIE III : GASTEROPODES STYGOBIES.....	209
III.1 La " théorie des bouchons " : schéma conceptuel des associations faunistiques.....	211
III.2 Variabilité morphologique chez <i>Moitessieria</i> cf. <i>rolandiana</i>	214
III.2.1 Matériel et méthodes.....	215
III.2.2 Résultats	216
III.2.3 Discussion	217
III.3 Structuration génétique : Dark side of the earth.....	218
III.4 Test d'amplification de l'ADN environnemental souterrain	241
III.4.1 Matériel et méthodes.....	241
III.4.2 Résultats	242
III.5.3 Conclusion et perspectives.....	242
III.5 Quel déterminisme de la distribution des taxons ?	243
Rappel des principaux résultats de la partie III	256
PARTIE IV : DISCUSSION GENERALE	259
IV.1 Schéma théorique d'insularité continentale : les flux de gènes reflètent-ils les flux d'eau ? .	260
IV.2 Evolution de la liste de référence : apports taxonomiques et limites	260
IV.2.1 Combien d'espèces de naïades en Europe ?.....	261
IV.2.2 Les sous-espèces	261
IV.2.3 Combien d'espèces de mollusques souterrains dans les karsts de France ?.....	262
IV.3 Les outils d'une taxonomie opérationnelle	264
IV.3.1 Taxonomie traditionnelle : morphométrie, écotypes et phylotypes.....	264
IV.3.2 Taxonomie moléculaire opérationnelle	264
IV.3.3 Vers des listes de référence opérationnelles : s'affranchir du fardeau taxonomique.....	265
IV.3.3.1 Des noms qu'on ne pourra pas réévaluer.....	265
IV.3.3.2 La synonymisation constitue-t-elle une perte de puissance en termes de conservation ?	266
IV.4 Conservation	267
IV.4.1 Structuration génétique et abondance : qu'y avait-il alors qu'il n'y a plus ?.....	267
IV.4.2 Nouvelles espèces et anciennes lois, biodiversité contre " sociodiversité "	268
BIBLIOGRAPHIE	271
GLOSSAIRE.....	280
ANNEXE I : LISTE DES SPECIMENS DE BIVALVES COLLECTES.....	281
ANNEXE II : SEQUENCES DISPONIBLES ET SEQUENCES PRODUITES.....	300

Liste des articles (publiés, soumis ou en préparation) inclus dans cette thèse

ARTICLE 1

Gargominy, O., **Prié, V.**, Bichain, J.-M., Cucherat, X. & Fontaine, B. 2011. Liste de référence annotée des mollusques continentaux de France. *MalaCo*, 7: 307-382. - *Extraits*

ARTICLE 2

Fontaine, B., Bichain, J.-M., Cucherat, X., Gargominy, O. & **Prié, V.** 2010. Les noms français des mollusques continentaux de France : Processus d'établissement d'une liste de référence. *Revue d'écologie (Terre Vie)*, 65(4): 1-25. - *Extraits*

ARTICLE 3

Prié, V., Puillandre, N. & Bouchet, P. 2012. Bad taxonomy can kill: molecular reevaluation of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Unionidae) and its accepted subspecies. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 405: 18.

ARTICLE 4

Froufe, E., **Prié, V.**, Sobral, C., Teixeira A., Sousa R., Varandas, S. & Lopes-Lima, M. *submitted*. Extremely low genetic diversity within the near-threatened freshwater mussel *Potomida littoralis* (Cuvier, 1798) in Western Europe. *Journal of Biogeography*.

ARTICLE 5

Prié, V. *in prep.* Is the French freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera brunnea* (Bonhomme 1840) a taxonomic unit? *Journal of Molluscan studies*

ARTICLE 6

Prié, V. & Puillandre, N. 2013. Molecular phylogeny, taxonomy and distribution of French *Unio* species (Bivalvia, Unionidae). *Hydrobiologia* (SI Freshwater bivalves).

ARTICLE 7

Prié, V., Molina, Q. & Gamboa, B. 2013. French Naiad (Bivalvia: Margaritiferidae, Unionidae) Species Distribution Models: prediction maps as tools for conservation. *Hydrobiologia* (SI Freshwater bivalves).

ARTICLE 8

Prié, V., Puillandre, N., Bouchet, P. *in prep.* Dark side of the earth: cryptic species in cryptic places challenge alpha-diversity assessments. *Frontiers in zoology*

ARTICLE 9

Prié, V., Ladouche, B., Bas, Y. & Batiot, C. *submitted*. Faune stygobie et qualité de l'eau – un essai sur la vulnérabilité des écosystèmes souterrains. *Karstologia*

*La présente thèse ne constitue pas une publication au sens
du Code International de Nomenclature Zoologique.
[Code, Recommandation 8E]*

Introduction

CONTEXTE PROFESSIONNEL

Cette thèse de doctorat s'inscrit dans le contexte particulier de thèse en entreprise, réalisée au sein du bureau d'études Biotope, entreprise spécialisée dans l'expertise naturaliste et les études faune, flore et environnement. Biotope a été créé en 1993 par trois naturalistes passionnés qui ont pressenti que la prise en compte des enjeux écologiques allait devenir centrale dans l'évolution de notre société. En effet, depuis cette date, la demande des entreprises, des aménageurs, des collectivités locales et des services de l'état n'a cessé de croître, au point que Biotope regroupe aujourd'hui près de 250 salariés répartis dans 18 agences (dont la Guyane, la Réunion, Madagascar et la Serbie), auxquelles s'ajoute un service édition & communication. L'essentiel du marché concerne les études d'impact liées aux grands projets d'aménagement tels que les réseaux de transport (lignes à grande vitesse, autoroutes), l'urbanisation, les fermes éoliennes etc. Biotope met à disposition de ses clients des experts naturalistes, des paysagistes, des géomaticiens, des chefs de projets, pour assurer la conformité des projets avec la réglementation et faciliter leur intégration dans l'environnement. Le travail de bureau d'études se situe à l'interface entre des enjeux de conservation, des enjeux législatifs et des enjeux socio-économiques (Fig. 1). Les bureaux d'études ont donc un objectif d'excellence en termes de prospections de terrain et de détermination des espèces, ils doivent maîtriser les contraintes réglementaires et comprendre les contraintes économiques de leurs clients. En tant que structure privée, ils doivent également assurer la viabilité économique de leur entreprise et être compétitifs face à leurs concurrents.

Biotope dispose depuis 2006 d'un service Recherche et Développement, j'en suis salarié depuis sa création. Il a pour vocation la mise en place d'outils pour faciliter et optimiser le travail des experts du bureau d'études, notamment en développant de nouvelles techniques d'inventaire ou de prospections, des technologies innovantes pour répondre aux attentes de ses clients et un appui scientifique aux experts de terrain.

Les bureaux d'étude se composent d'experts compétents, dont le métier est de déceler, d'observer, de collecter et surtout de déterminer des taxons sur le terrain. Ils sollicitent pour cela les connaissances fournies par les biologistes, en particulier les taxonomistes, et ont besoin d'outils fiables et efficaces pour répondre à des questions locales concrètes, enracinées dans des problématiques globales de conservation. La mise en politique (Latour 1999) des enjeux de conservation fait porter des responsabilités morales et économiques importantes à ces experts. Ce travail vise à leur fournir des outils de **taxonomie opérationnelle**, soit à la fois une clarification taxonomique (réactualiser les listes de référence à l'aide d'outils modernes pour définir quelles sont les unités de gestion) et des méthodes fiables permettant de déterminer les taxons (application de l'approche barcode pour les taxons étudiés).

C'est dans ce cadre que j'ai proposé ce sujet de thèse, avec pour objectif d'améliorer les réponses que les experts peuvent fournir quant aux mollusques aquatiques patrimoniaux, qui posent des problèmes taxonomiques, sont difficiles à collecter et à déterminer sur le terrain, mais sont directement visés par les textes législatifs. Un des objectifs de ce travail est donc de rendre la taxonomie opérationnelle (Fig. 1), de développer des méthodes de prospection adaptées et des outils pratiques pour la détermination des taxons.

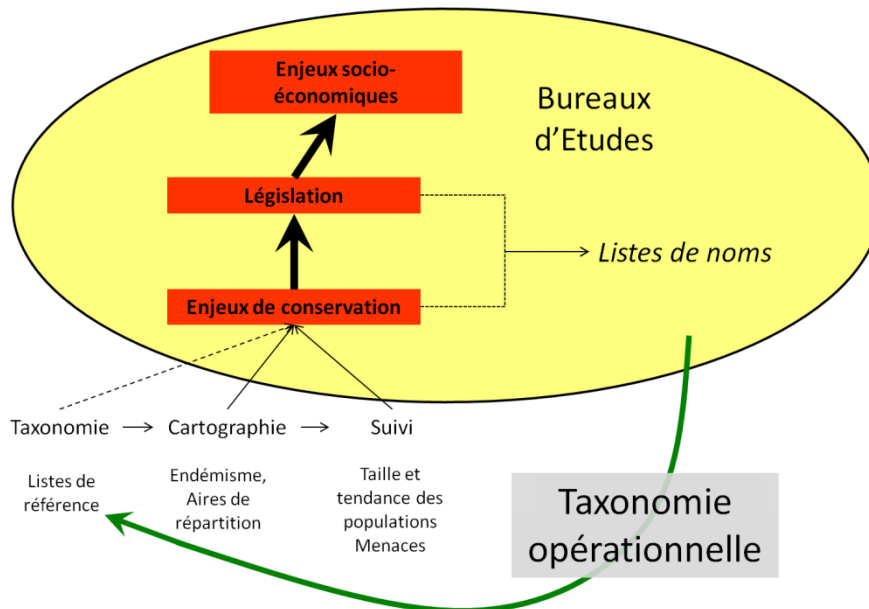


Figure 1 : La sphère des bureaux d'études englobe la conservation, la législation et les enjeux socio-économiques. Ce schéma repose finalement sur des listes de noms : les enjeux de conservation sont définis à la base sur des unités taxonomiques, lesquelles sont reprises par les textes de loi. L'application des textes de loi suppose une détermination opérationnelle, sur le terrain, des unités taxonomiques visées par les noms.

CONTEXTE ECONOMIQUE

Si la part des études environnementales reste généralement négligeable en regard du coût global des aménagements, leurs résultats peuvent impliquer des surcoûts importants, voire même le rejet d'un projet. Ainsi, l'arrêt des travaux de l'autoroute A28 au sud du Mans en raison de la présence du scarabée Pique-Prune *Osmoderma eremita* Scopoli, 1763 a marqué les esprits.

La préoccupation environnementale fait aujourd'hui parti de la conception même des projets. En 2012, le Ministère de l'Environnement, du Développement Durable, du Logement et des Transports (MEDDLT) a imposé la séquence " Eviter – Réduire – Compenser ", qui recadre les obligations des maitres d'ouvrages au regard des enjeux environnementaux et encourage la prise en compte des contraintes environnementales dès la conception des projets. Les enjeux économiques liés aux prestations des bureaux d'études sont tels que le Ministère a commandé un rapport sur les pratiques de l'évaluation environnementale, qui préconise la mise en place d'une certification des bureaux d'études en environnement (Lavoux 2011).

En réponse aux besoins grandissants des aménageurs, l'activité des bureaux d'études s'est considérablement développée ces dix dernières années (Fig. 2), avec un chiffre d'affaire cumulé dépassant les 50 millions d'euros en 2012 pour les principaux bureaux d'études spécialisés en faune-flore-environnement.

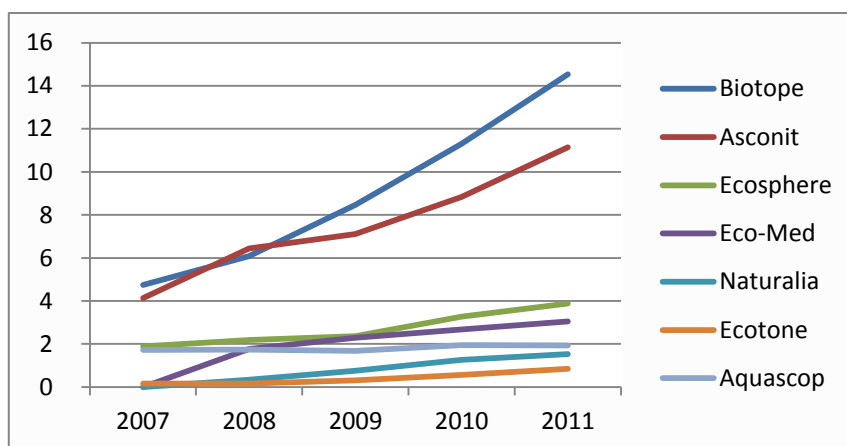


Figure 2 : Evolution du chiffre d'affaire des principaux bureaux d'études français en faune – flore - environnement entre 2007 et 2012 (en millions d'Euros ; source : www.societe.com).

ENCART I : Les surcouts liés à la conservation de la nature dans le cadre de projets d'aménagements

Les études d'impact environnemental varient en fonction de la taille des projets mais représentent en moyenne 1% du coût total des projets, soit en moyenne 41 000 €, ce qui représente entre 550 et 850 million d'Euros par an en Europe. Le coût des mesures compensatoires, pour une zone humide par exemple, varie entre 6 000 € et 1,2 millions d'Euros par hectare aux USA ; entre 30 000 et 100 000 € par hectare en Europe. Le marché annuel de la compensation à l'échelle de la planète est estimé au minimum à 2,4 milliard de dollars, et plus vraisemblablement autour de 4 milliards de dollars (Conway et al. 2013).

Exemples issus d'études menées par Biotopie :

Extension de carrière

Dans le cadre d'une demande d'extension d'une carrière sur 36 ha de zones de garrigues abritant 21 espèces protégées jugées patrimoniales (une espèce d'insecte, deux espèces de reptiles, dix-sept espèces d'oiseaux et une espèce de chauve-souris), les mesures compensatoires ont été fixées à 530 000 € pour 25 ans ; dont \approx 100 000 € d'études de faisabilité des mesures de suivi des effets (à destination des bureaux d'études et des associations qui effectueront le suivi et l'accompagnement des mesures mises en œuvre), et \approx 350 000 € de mesures compensatoires (dont \approx 280 000 € à destination des agriculteurs, des entreprises de débroussaillage et autres travaux de terrain ; le reste pour la structure animatrice des mesures – en général un Conservatoire des Espaces Naturels).

Ligne de train à grande vitesse

Le franchissement de la Vienne par la ligne de train à grande vitesse a nécessité le déplacement des populations de Grande Mulettes *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) et de Mulettes épaisses (*Unio crassus*, Philipsson, 1788). Les inventaires préalables, le déplacement des individus et le suivi des populations déplacées auront coûté 400 000 € entre 2008 et 2012 (sans compter les mesures compensatoires).

Une ligne de train à grande vitesse détruira les places de chant de 70 outardes canepetière *Tetrax tetrax* (Linnaeus, 1758). Les mesures compensatoires pour cette espèce très patrimoniale ont été fixées à 25 000 000 € étalés sur 25 ans.



CONTEXTE REGLEMENTAIRE

Les espèces prises en compte dans les études d'impact ou d'incidence sont essentiellement les espèces listées aux articles 2 à 4 de la Loi n° 76-629 du 10 juillet 1976 relative à la protection de la nature (qui définit la liste des espèces protégées sur le territoire national) ainsi que les espèces listées aux annexes de la Directive 2009/147/CEE du Conseil de l'Europe, du 2 avril 1979 (ci-après appelée " Directive Oiseaux ") I et II de la Directive 92/43/CEE du Conseil de l'Europe, du 21 mai 1992, concernant la conservation des habitats naturels ainsi que de la faune et de la flore sauvages (ci-après appelée " Directive Habitats "). S'ajoutent les espèces bénéficiant d'un statut de protection régional (flore essentiellement) et celles qui sont déterminantes pour la désignation des Zones Naturelles d'Intérêt Ecologique, Faunistique ou Floristique (ZNIEFF). Les ZNIEFF n'ont pas de portée réglementaire directe, mais la loi de 1976 sur la protection de la nature impose aux Plans Locaux d'Urbanisation de respecter les préoccupations d'environnement, et interdit aux aménagements projetés de " détruire, altérer ou dégrader le milieu particulier " à des espèces animales ou végétales protégées (lesquelles sont reprises dans les ZNIEFF). Dans certains cas litigieux, la jurisprudence a considéré que les ZNIEFF constituent un porté à connaissance d'enjeux environnementaux, un élément d'expertise, qui doit être pris en considération par les tribunaux administratifs et le conseil d'état.

L'aménageur se trouve donc confronté à des listes de noms vertigineuses : 884 taxons listés aux annexes des Directives européennes ; 1 749 taxons protégés au niveau national ; 7 360 taxons protégés à l'échelle régionale (en incluant les départements et territoires d'outre mer ; source : INPN, inpn.mnhn.fr, consulté en juin 2013). Bien souvent, en particulier pour les invertébrés, les noms listés dans ces textes réglementaires ne correspondent plus aux noms utilisés par la communauté scientifique. Dans certains cas, la synonymie est facile à établir et le nouveau nom est couvert par le texte juridique. Dans le cas de scission d'une espèce en plusieurs autres, de nouveaux noms sont attribués. L'application ou non du statut de protection au taxon nouvellement nommé reste un flou juridique.

Le contexte réglementaire est donc complexe et nécessite déjà en lui-même le conseil et l'expertise des bureaux d'études. Ces derniers décortiquent ces listes de noms et sont inmanquablement confrontés aux problèmes de détermination des espèces, et parfois directement aux problèmes taxonomiques. D'où la nécessité d'une taxonomie opérationnelle pour répondre aux enjeux législatifs et économiques liés aux problématiques écologiques de nos sociétés actuelles (Fig. 3).

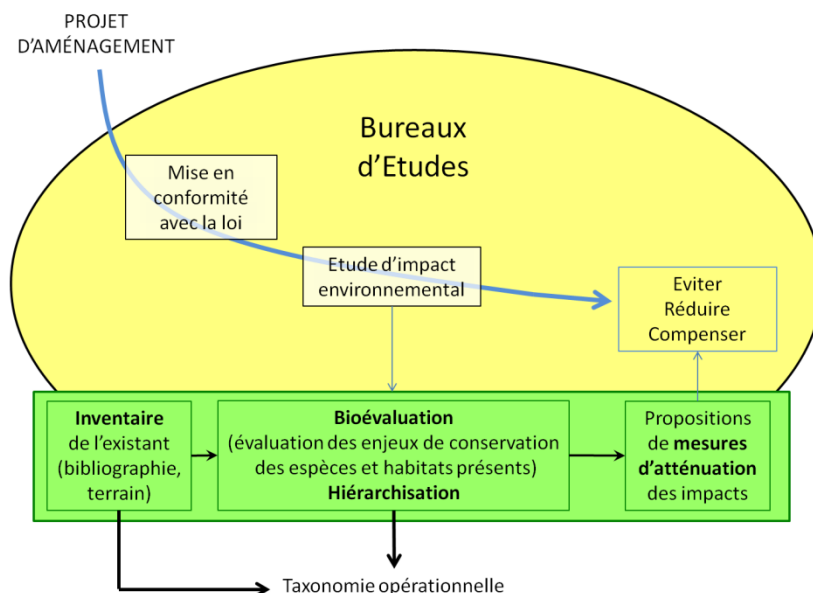
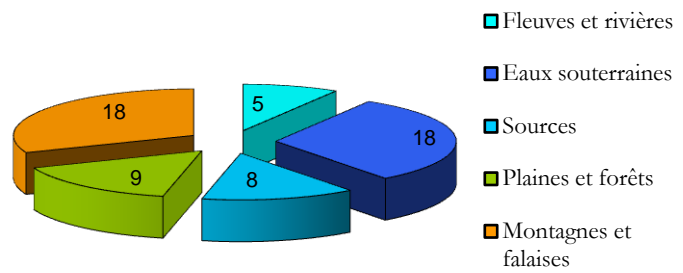


Figure 3 : processus de mise en conformité des projets d'aménagement avec la législation sur la protection de la nature. Les bureaux d'études sont sollicités principalement pour l'étude d'impact (ou d'incidence pour les aménagements touchant aux sites Natura 2000), qui comprend généralement trois phases : l'inventaire, la bioévaluation et les propositions. Ils sont de plus en plus impliqués à l'amont, lors de la conception des projets, et à l'aval par exemple dans les suivis de chantiers. L'étape cruciale reste la détermination sur le terrain des espèces potentiellement impactées par le projet, qui nécessite de s'appuyer sur une taxonomie opérationnelle, autant dans les textes que dans les moyens techniques de reconnaître les taxons.

J'ai choisi de travailler sur les mollusques aquatiques continentaux, qui représentent plus de la moitié des espèces de mollusques protégées en France (Fig. 4), sont souvent difficiles à récolter et à déterminer, et dont la taxonomie n'est pas stabilisée.

Figure 4 : distribution des espèces de mollusques protégées en France selon les grands types d'habitats. Les chiffres indiquent le nombre d'espèces. Les espèces dulçaquicoles représentent plus de la moitié des mollusques protégés.



OBJECTIFS GENERAUX DE LA THESE

Ce travail s'inscrit dans la problématique de conservation des mollusques dulçaquicoles de France continentale. En effet, ces espèces présentent des enjeux de conservation importants mais restent les parents pauvres des politiques environnementales, principalement parce qu'elles sont mal connues. Cette méconnaissance globale tient à plusieurs raisons : espèces peu charismatiques, difficulté d'observation (soit en raison de leur taille, soit en raison de leur milieu de vie) ; taxonomie conflictuelle ; difficulté de détermination sur le terrain.

La majorité des espèces de mollusques aquatiques d'intérêt patrimonial appartient à deux groupes (Fig. 4, Tableau I) diamétralement opposés : les naïades qui regroupent les grandes espèces de bivalves d'eau douce et les gastéropodes stygobies, qui sont des escargots minuscules inféodés aux réseaux karstiques. Les naïades figurent parmi les espèces de mollusques les plus étudiées et leurs aires de répartition englobent une part importante des hydrosystèmes de France ; les gastéropodes stygobies sont largement méconnus et généralement micro-endémiques d'hydrosystèmes karstiques restreints.

La première étape pour une meilleure prise en compte des mollusques dans les schémas et les politiques de conservation (Fig. 1, 6), est de stabiliser leur taxonomie, c'est-à-dire de bien délimiter les unités de conservation, soit les unités évolutives.

Un schéma théorique d'**insularité continentale**, implicitement admis par la communauté scientifique (ex. Bouchet 2002 ; Davis 2004), postule que les barrières biogéographiques sont à l'origine de la répartition des taxons : la spéciation suivrait l'insularité continentale liée à la structure des hydrosystèmes (Fig. 5). La délimitation des unités de conservation pourrait et devrait alors être spatialisée en suivant les bassins-versants de fleuves pour les naïades, de sources pour les gastéropodes stygobies.

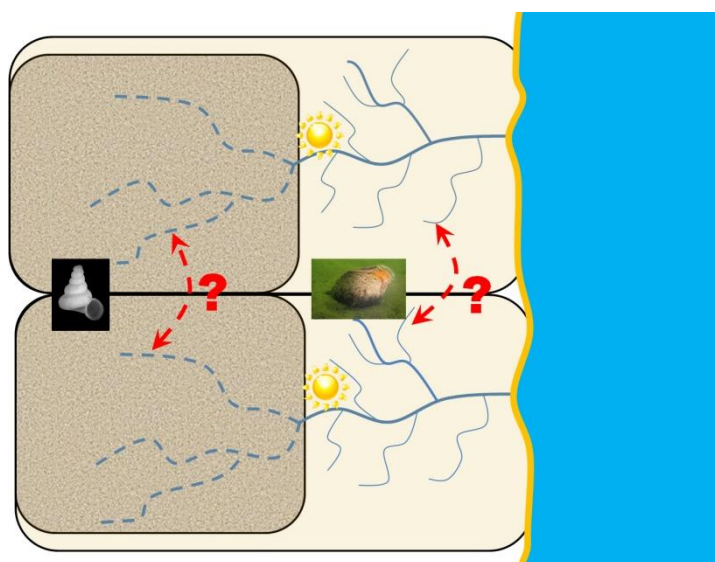
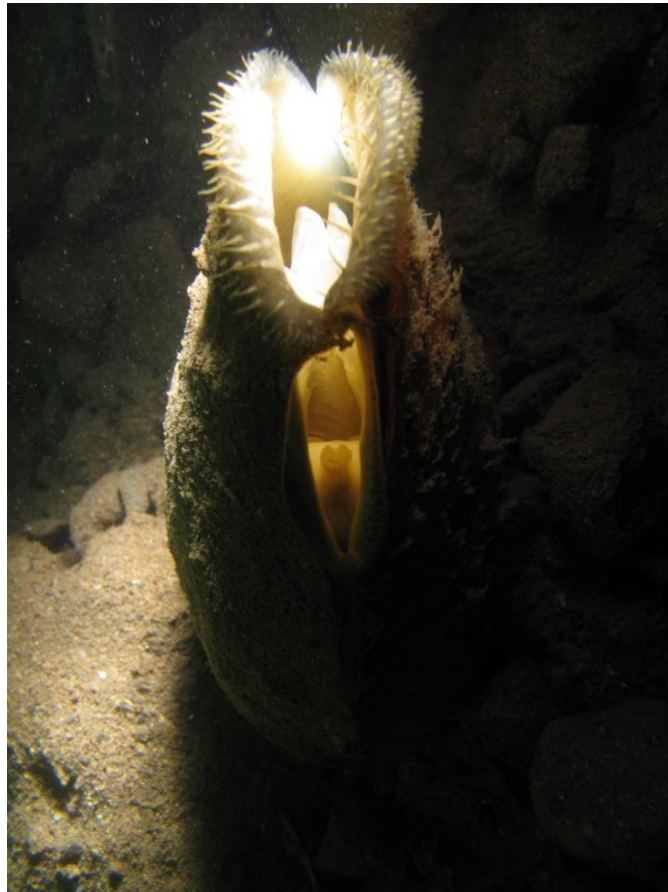


Figure 5 : schéma théorique de l'insularité continentale pour deux groupes de mollusques dulçaquicoles : les gastéropodes stygobies (à gauche) et les naïades (à droite). Dans les deux cas, la limite amont de la dispersion est la zone sans eau (la zone vadose pour les karsts, la limite de présence des poissons-hôtes pour les naïades). La limite aval est constituée pour les organismes stygobies par l'exurgence (avec la présence de la lumière) et pour les naïades par l'embouchure des fleuves (avec la présence des eaux salées). Les unités de conservation seraient alors respectivement les bassins-versants de sources et de fleuves. La question des connexions entre ces unités est posée.

Le présent travail propose de tester cette hypothèse biogéographique. Quelles échelles pour la délimitation des taxons et des unités de conservation ? La structure biogéographique contraint-elle la répartition des taxons ? L'insularité continentale est-elle à l'origine de la délimitation des taxons ? Les enjeux de conservation peuvent-ils être spatialisés suivant l'hydrologie ? Les flux de gènes reflètent-ils les flux d'eau ? Ou existe-t-il d'autres mécanismes permettant la dispersion par-delà les barrières géographiques ?

J'expose dans une première partie des généralités sur l'application des noms et les mécanismes de la conservation et présente les deux modèles étudiés ainsi que les méthodes mises en œuvre. Les parties II et III sont respectivement consacrées aux naïades et aux gastéropodes stygobies ; la partie IV est une discussion générale sur les résultats obtenus.

Partie I : généralités, présentation des modèles et méthodes



I.1 NOMMER ET CLASSER LES ESPECES

Le déclin de la biodiversité est l'un des témoins de l'influence de l'homme sur son environnement. La quantification de ce déclin repose le plus souvent sur la notion d'espèce (Gaston 2000; Agapow *et al.* 2004) ; en pratique sur des listes de noms. Le gestionnaire ou le législateur impliqués dans la protection de la biodiversité s'appuient ainsi sur plusieurs listes de noms, liées les unes aux autres, telles que les listes de référence (Check Lists), les listes rouges (Red Lists), les listes d'espèces protégées, les annexes de traités internationaux... jusqu'aux listes d'espèces produites par des inventaires ciblés dans le cadre par exemple des études d'impact environnemental relatives aux projets d'aménagement.

L'application des noms suit des règles différentes pour le biologiste, le législateur ou le philosophe. Pour le juriste, l'application du nom est défini soit *in concreto*, c'est-à-dire en s'appuyant sur des textes qui définissent les mots, comme les textes déposés pour une marque par exemple, ou l'état-civil pour un nom de personne ; soit *in abstracto*, c'est-à-dire selon le sens commun, l'usage normal. La définition du nom *in concreto* dans le cadre de la législation sur la protection de la nature reposera sur la définition qu'en font les biologistes. Je présente dans ce chapitre les règles qui prévalent à l'application du nom pour le biologiste, le concept de l'espèce, la liste des noms valides de gastéropodes stygobies et de naïades et les noms vernaculaires établis en préalable à ce travail.

I.1.1 Nomenclature et concept de l'espèce

I.1.1.1 La nomenclature binomiale et le Code

La nomenclature binomiale et la classification systématique sont introduites par Linné en 1758. Le nom prend une importance toute particulière avec la maxime "Nomina si nescis, perit et cognito rerum" (si tu ignores le nom des choses, tu en perds aussi la connaissance ; formule due à Edward Coke, 1552 - 1634)¹. La notion d'espèce est la base de cette classification. Elle est définie comme un "ensemble d'individus qui engendrent, par la reproduction, d'autres individus semblables à eux-mêmes" (définition empruntée à John Ray, naturaliste anglais, 1627 – 1705, un précurseur du Biological Species Concept). Bien qu'étant à la base du système linnéen, l'espèce est dénommée en premier lieu par son appartenance à un genre (par la suite, les noms de genre peuvent être modifiés en fonction des avancées de la systématique, mais l'épithète spécifique, lui, doit être maintenu). L'auteur et la date de la description sont attachés au nom des espèces.

Depuis 1895, le cadre de la création et de l'utilisation des noms d'animaux est donné par l'International Code of Zoological Nomenclature (ci-après désigné "Code"). "Zoological nomenclature is the system of scientific names applied to taxonomic units (...) of extant or extinct animals." Pour des raisons pratiques, les différents niveaux taxonomiques sont classés selon des rangs homologues, définis comme "The level, for nomenclatural purposes, of a taxon in a taxonomic hierarchy (e.g., all families are for nomenclatural purposes at the same rank, which lies between superfamily and subfamily)".

Pour être disponible, un nom d'espèce doit avoir été proposé en 1758 ou après ; apparaître dans un ouvrage qui a appliqué systématiquement le principe de la nomenclature binomiale ; être accompagné d'une description ou référence taxinomique (par exemple un ouvrage antérieur qui décrit l'espèce mais ne cite pas le nom valide) ou d'une référence à une telle description ; avoir satisfait des critères supplémentaires. Par exemple, les descriptions d'espèces publiées après 1999 doivent inclure la désignation de matériel type.

I.1.1.2 Matériel et station type

Le nom choisi lors de la description d'une espèce doit se rapporter à un matériel type : l'holotype est le spécimen unique qui porte le nom, les autres spécimens de la série type sont des paratypes. Si la description originale ne désigne pas d'holotype, le matériel auquel le nom fait référence est constitué de syntypes.

Le lieu de récolte de ces spécimens est la station type. En l'absence de matériel type (cas des descriptions anciennes, ou quand celui-ci a été perdu) ou si le matériel ne permet pas d'appliquer des méthodes modernes telles que les analyses moléculaires (cas d'une grande partie du matériel type chez les

¹ Un proverbe chinois dit : "The first part of knowledge is getting the names right". Cité par Grimaldi & Engel (2005).

mollusques, puisqu'il s'agit généralement de coquilles), les réviseurs s'appuient sur du matériel provenant de la station type. C'est cette démarche qui a été mise en œuvre ici pour l'étude des différents taxons de naïades (Prié 2012 ; Prié *et al.* 2012 ; Prié & Puillandre 2013).

I.1.1.3 Espèce taxonomique vs espèce nominale

On désigne par "espèce taxonomique" une espèce considérée comme valide. Des révisions taxonomiques peuvent conduire à la mise en synonymie d'espèces précédemment considérées comme valides. Dans ce cas, le nom le plus ancien sera retenu (Principe de Priorité), les autres noms mis en synonymie².

On désigne par "espèce nominale" une espèce décrite mais qui n'est plus considérée comme valide. Son nom reste disponible, mais n'est pas valide.

I.1.1.4 Délimitation de l'espèce aujourd'hui

Pour les approches de taxonomie, et en particulier de délimitation d'espèces, le cadre conceptuel suivit au cours de cette thèse est celui développé dans l'équipe de recherche où elle se déroule.

La communauté scientifique s'accorde globalement sur le fait que seule l'espèce a une réalité biologique (Mayr 1982). Plusieurs dizaines de concepts ont été proposés pour définir ou délimiter les espèces (voir De Queiroz 2007 pour une revue des concepts). De Queiroz (1998) critique les plus usités, le Biological Species Concept (BSC, Mayr 1942, qui s'attache surtout à l'interfécondité et l'isolement reproductif) ; et le Phylogenetic Species Concept (PSC, Nixon & Wheeler 1990, qui considère une espèce comme un ensemble d'individus ayant une histoire évolutive commune), considérées non pas comme des définitions de l'espèce mais comme des critères de reconnaissances des espèces, qui se mettent en place plus ou moins rapidement au cours du processus de spéciation (De Queiroz 1998, 2007 ; Puillandre 2008 ; Castelin 2010). Il propose un concept unifié pour l'espèce, formalisé par la suite par Samadi & Barberousse (2006), le Lineage Species Concept (LSC) : une espèce est un réseau d'organismes définitivement divergent des autres.

Dans ce contexte, le réseau généalogique des spécimens étant inaccessible, les espèces sont donc délimitées de façon indirecte, autrement dit inférées à partir de ce qui est observé actuellement. Les critères établis par le LSC pour reconnaître les espèces restent (i) la ressemblance, qu'elle soit morphologique ou moléculaire ; (ii) l'isolement reproductif, soit un isolement pré- ou post-zygotique, qui ne soit pas lié uniquement aux barrières géographiques par exemple et (iii) le critère phylogénétique : les membres d'une même espèce partagent une histoire commune, distincte de celle des autres espèces. Ces critères fournissent un faisceau d'arguments, mais pas de preuves ; aucun n'est en soit nécessaire ou suffisant (Puillandre, 2008). Ils restent difficiles à mettre en évidence de manière sûre. Par exemple, (i) les espèces cryptiques illustrent les limites du critère phénétique basé sur une analyse morphologique. (ii) L'interfécondité est difficile à tester concrètement. Une forme d'isolement reproductif peut résulter *de facto* d'une barrière géographique, mais les populations peuvent à nouveau échanger des gènes lors de remises en contact (ex. Beaumont *et al.* 2004 ; Gay *et al.* 2007). Il n'y a pas dans ce cas de véritable *isolement reproductif* au sens de Mayr (1982) ("The words 'reproductively isolated' are the key words of the biological species definition"). Une distance génétique importante est habituellement corrélée à un isolement reproducteur, mais il existe de nombreux contre-exemples (Ferguson 2002). Des différences peuvent se fixer chez des populations allopatriques sans qu'il y ait d'isolement reproductif à proprement parler, en revanche, elles ne peuvent se fixer pour des populations sympatriques que s'il y a un isolement reproductif. (iii) Il est difficile de définir des caractères héréditaires permettant de retracer l'histoire phylogénétique des espèces. Dans le cas de caractères moléculaires, les différences doivent s'être fixées depuis l'évènement de spéciation, sans quoi la phylogénie des caractères ne sera pas en accord avec la phylogénie des espèces (Nichols 2001). Les espèces sont donc considérées comme des hypothèses qui seront confirmées ou non par l'analyse de différents caractères (morphologiques, moléculaires,...) et l'application de différents critères (ressemblance, monophylie, interfécondité,...), dans un cadre de taxonomie intégrative (Dayrat 2005 ; Will *et al.* 2005 ; De Queiroz 2007 ; Wiens 2007 ; Samadi &

² L'inversion de préséance est permise dans certaines conditions définies par le Code (article 23.9), par exemple quand un synonyme ou homonyme plus ancien n'a pas été employé comme valide après 1899 et que son synonyme ou homonyme plus récent a été employé pour un taxon particulier, comme son nom présumé valide, dans au moins 25 travaux, publiés par au moins 10 auteurs au cours des 50 ans immédiatement précédents, et couvrant une période d'au moins 10 ans.

Barberousse 2009 ; Schlick-Steiner *et al.* 2009 ; Barberousse & Samadi 2010 ; Yeates *et al.* 2010 ; Reeves & Richards 2011). Le taxonomiste peut proposer des hypothèses primaires de délimitation d'espèces (" Primary Species Hypothesis " dans les ARTICLE 6 et 8), mais il doit s'appuyer sur un faisceau d'arguments pour conclure. Les hypothèses primaires se basent traditionnellement sur la morphologie, approche qui a montré ses limites. L'ADN est un caractère héritable de plus en plus employé pour la délimitation des espèces (voir p. ex. Davis & Nixon 1992 ; Waters 2002 ; Hebert *et al.* 2003 pour les articles fondateurs ; Lefébure *et al.* 2006a, b, c pour les organismes stygobies ; Bichain *et al.* 2007a ; Bichain *et al.* 2007b ; Puillandre *et al.* 2012 pour les mollusques aquatiques).

L'approche de taxonomie opérationnelle développée ici se base principalement sur des analyses moléculaires (Padial & De la Rivera 2007). Les unités taxonomiques sont définies dans ce contexte comme des unités évolutives distinctes, reconnaissables par l'analyse de fragments de gènes choisis. Les unités de conservation découlent de la redéfinition de ces unités taxonomiques ; qui peuvent être des espèces, ou des lignées évolutives remarquables au sein des espèces, pour lesquelles le concept de sous-espèce peut être employé (ce qui permet d'y appliquer un nom). J'ai essayé d'utiliser au moins deux marqueurs indépendants pour tester l'hypothèse d'une absence de recombinaison entre les espèces. Les caractères biogéographiques, morphologiques et écologiques ont également été regardés. L'utilisation de spécimens provenant des stations-types a permis de lier les noms disponibles aux unités évolutives observées.

L'ensemble des travaux de délimitation d'espèces présentés dans cette thèse suivent ce contexte théorique et pratique, même si les caractères analysés, les critères appliqués et les méthodes utilisés peuvent varier d'un cas à l'autre. Dans chaque article la méthode de délimitation d'espèces est développée, les caractères, critères et méthodes choisis sont détaillés autant que possible.

I.1.2 Checklists : la stabilité en sursis des noms d'espèce

Toute la difficulté pour le taxonomiste est de calquer des *catégories*, définies par le Code de Nomenclature dérivé de Linné, sur un *arbre phylogénétique*, puisque depuis Darwin la parenté est au centre de la classification. L'arbre est en perpétuelle évolution, parce que l'avancée des connaissances produit sans cesse des ramifications qui tendent vers la réalité, sans jamais l'atteindre complètement. En conséquence, le contenu des catégories change en permanence, et peut ne pas faire l'objet d'un consensus. Ces changements sont rythmés par les publications de révisions taxonomiques et les listes de références.

Les listes de référence (Checklists), n'ont pas vocation à produire des données nouvelles, mais à compiler les hypothèses les plus récentes qui constituent l'état de l'art de la taxonomie. En préalable à ce travail, j'ai participé à l'établissement d'une liste de référence des mollusques continentaux de France métropolitaine (ARTICLE 1). Cette liste constitue la base du travail de réévaluation des unités taxonomiques.

ARTICLE 1

Gargominy, O., Prié, V., Bichain, J.-M., Cucherat, X. & Fontaine, B. 2011. Liste de référence annotée des mollusques continentaux de France. *MalaCo*, 7: 307-382.

- Extraits -

Liste de référence annotée des mollusques continentaux de France

Annotated checklist of the continental molluscs from France

Olivier GARGOMINY¹, Vincent PRIÉ², Jean-Michel BICHAIN³, Xavier CUCHERAT⁴, Benoît FONTAINE⁵

¹ Service du Patrimoine Naturel, Muséum national d'Histoire naturelle, CP41, 36 rue Geoffroy Saint-Hilaire, 75005 Paris

² Biotope, Service R&D, 22, Bd Maréchal Foch, BP58, 34140 Mèze

³ 1, rue des Forgerons, 68140 Gunsbach

⁴ Biotope, Nord-Littoral, Avenue de l'Europe/ZA de la Maie, 62720 Rinxent

⁵ CERSP UMR 7204, Département Ecologie et Gestion de la Biodiversité, Muséum national d'Histoire naturelle, CP 51

55 rue Buffon, 75005 Paris

Correspondance : gargo@mnhn.fr

Résumé – Depuis la publication de la Liste de référence des mollusques continentaux de France par Falkner *et al.* (2002), le nombre de changements est tel qu'une mise à jour a été nécessaire. Nous présentons donc une Liste de référence réactualisée, où tous les changements (nouveaux noms, actes taxonomiques et nomenclaturaux) par rapport à celle de 2002 sont liés à une note faisant référence à la bibliographie concernée, consultée jusqu'à fin 2010. Au total, ce sont 93 taxons terminaux qui viennent enrichir la malacofaune de France, dont 61 récemment décrits et 20 qui en sont retirés. Cette faune compte actuellement 783 taxons terminaux (695 espèces) avec un taux d'endémisme de 43 %. La présente liste a pour vocation de fournir le nouveau cadre taxonomique résultant de dix années de recherches sur la systématique des mollusques continentaux. Aucun acte nomenclatural ou taxonomique nouveaux n'a été réalisé lors de ce travail.

Mots-clefs – Liste de référence, France, mollusques continentaux.

Abstract – An update of the checklist of continental molluscs of France by Falkner *et al.* (2002) is presented. All changes (new names, taxonomical and nomenclatural acts) are supported by a note referring to the bibliography (up to the end of 2010). Altogether, 93 terminal taxa are added to the French fauna, including 61 recently described; 20 are removed. This fauna totals 783 terminal taxa (695 species) with an endemism rate of 43%. This list aims to provide an updated taxonomic framework, resulting from ten years of research on mollusc systematics. The list includes no new nomenclatural or taxonomic acts. An extended abstract in English is given at the end of the paper.

Keywords – Checklist, France, non-marine molluscs.

Introduction

Avec le besoin croissant de bases de connaissances sur le patrimoine naturel, les Listes de référence, ou *Checklists*, sont devenues un outil essentiel de communication entre les taxonomistes et les utilisateurs de noms d'espèces (gestionnaires de données naturalistes, gestionnaires d'espaces naturels, écologues, généticiens, muséologues, enseignants et législateurs). Plusieurs listes ont ainsi vu le jour en Europe pour les mollusques continentaux dont Bodon *et al.* (1995) pour l'Italie, Falkner *et al.* (2001) et Bank *et al.* (2001b) pour CLECOM/Fauna Europaea, Falkner *et al.* (2002) pour la France, Glöer & Zettler (2005) pour l'Allemagne, Anderson (2005) et Bank *et al.* (2007) pour l'Angleterre, Horsák *et al.* (2010) pour la République tchèque et la Slovaquie. Ces listes fixent

les connaissances taxonomiques à un temps donné en proposant un ensemble de noms valides qui décrivent la faune, mais qui permettent aussi de fonder des études et des mesures de gestion sur un groupe de plus en plus identifié comme étant situé au cœur d'enjeux de conservation nationaux et internationaux (Lydeard *et al.* 2004, Régnier *et al.* 2009).

En France, les changements se sont accumulés depuis la publication de la Liste de référence des mollusques continentaux de Falkner *et al.* (2002), avec de nombreux remaniements taxonomiques et nomenclaturaux et des découvertes de taxons nouveaux pour notre territoire incluant des descriptions d'espèces nouvelles pour la science. Le nombre de nouvelles données – conséquence de l'activité scientifique de ces dernières années – est tel qu'il est apparu nécessaire d'actualiser cette liste.

L'élaboration d'un tel corpus nécessite de rassembler à travers une grande diversité de publications des opinions taxonomiques hétérogènes, quelquefois contradictoires, pour ne pas dire conflictuelles. Si la nomenclature est très réglementée par le Code international de nomenclature zoologique (ICZN 1999), une grande latitude est laissée aux auteurs de nouvelles espèces quant au choix des caractères retenus comme descripteurs. Une description basée sur un seul caractère, la forme de la coquille par exemple, est tout aussi valide au regard du Code qu'une autre qui utiliserait en parallèle la forme de la coquille, celle de l'opercule, les caractères discrets ou continus de l'anatomie, le type de radula, des marqueurs moléculaires, la biogéographie et le comportement. Tout est possible entre ces deux extrêmes. Indépendamment du nombre de descripteurs choisis, la précision des caractères retenus ; les comparaisons plus ou moins exhaustives avec les espèces proches, taxonomiquement ou géographiquement, participent également à la qualité des descriptions. Depuis une décennie, de nombreux débats se sont ouverts tant sur le concept d'espèce (Avisé & Ball 1990, Sites & Marshall 2003, De Queiroz 2005, Samadi & Barberousse 2006) que sur les méthodes de délimitation des groupes taxonomiques (Sites & Marshall 2004). Il en a émergé une approche de la taxonomie nommée par certains « taxonomie intégrative » (Dayrat 2005, Will *et al.* 2005, Samadi & Barberousse 2006, Vogler & Monaghan 2006), qui remet drastiquement en question les approches n'impliquant qu'un nombre restreint de caractères et/ou de méthodes de délimitation. De ce point de vue, l'élaboration d'une liste de référence des noms d'espèces valides n'est pas une mince affaire, puisque ses auteurs doivent prendre en compte tous les actes taxonomiques conformes au Code international de nomenclature zoologique et parfois trancher parmi des opinions d'auteurs divergentes. Difficulté supplémentaire, la constitution d'un référentiel taxonomique doit traiter de façon aussi homogène que possible tous les groupes, alors que les niveaux de connaissances, les approches méthodologiques et les sources bibliographiques sont multiples.

Même si l'un des objectifs d'une liste de référence est de stabiliser l'application des noms (Falkner *et al.* 2001), elle ne doit pas pour autant véhiculer et/ou enraciner des décisions taxonomiques douteuses ou arbitraires. Par ailleurs, une telle liste ne peut pas être un simple catalogue qui donnerait l'illusion que tous les problèmes sont résolus et que les noms proposés ont tous la même stabilité ou sont issus des mêmes approches taxonomiques (Davis 2004).

Il est donc nécessaire de définir clairement les méthodes qui aboutissent à l'élaboration d'une liste de référence. Cette lisibilité est probablement la

condition première pour qu'une telle liste conserve l'une de ses vocations, non pas d'être un point de fixation de la taxonomie, mais un catalogue argumenté des produits de l'activité scientifique.

Dans ce cadre général, nous proposons donc (1) une actualisation de la Liste de référence de 2002 à partir d'un corpus bibliographique 2001-2010 et (2) de fournir pour tous les changements des notes détaillées explicitant et liant les actes nomenclaturaux et/ou taxonomiques enregistrés à la bibliographie associée. Aucune décision taxonomique *ad hoc* n'a été prise lors du présent travail.

Matériel et Méthodes

Le point de départ de la Liste de référence 2010

La Liste de référence de Falkner *et al.* (2002) fournit le point de départ à la liste 2010, qui constitue donc une réactualisation. Depuis sa parution, la communauté scientifique a validé ou invalidé un certain nombre des propositions de Falkner *et al.* (2002), résultats qui sont pris en compte ici. Il faudra cependant encore plusieurs années avant que l'ensemble des hypothèses *ad hoc* posées par ces auteurs soit entièrement (re)visité.

En utilisant la Liste de référence 2002 comme base de la Liste de référence 2010, nous validons *de facto* les décisions qui y ont été prises. Ce choix de se baser sur la Liste de référence 2002 suit la recommandation de Bouchet (2006) sur le principe de conservation des noms : un taxon reste valide jusqu'à ce qu'il ait été prouvé invalide. En d'autres termes, il est préférable de laisser le bénéfice du doute sur la validité taxonomique d'une espèce plutôt que de l'enfouir dans la synonymie sans arguments solidement étayés.

Cependant, les taxons listés dans la Liste de référence 2002 qui ne sont pas attribués à une espèce nominale, c'est-à-dire qui apparaissent avec « sp. » derrière le nom de genre (28 espèces, *Helicella* sp. ou *Candidula* sp. par exemple) ou avec « ssp. » derrière le nom d'espèce (six sous-espèces), ne sont pas retenus dans la présente liste, ainsi que *Monacha* cf. *parumcincta* (Menke, 1828) (population introduite non déterminée et non confirmée). Tout en reconnaissant l'intérêt prospectif que représentent ces mentions, nous estimons que l'existence d'un nom scientifique valide est une base indispensable à l'inclusion d'une entité biologique dans une liste de référence.

Par ailleurs, à l'instar de Falkner *et al.* (2002), nous excluons les espèces exotiques non établies en France dans le milieu naturel, comme par exemple *Subulina striatella* (Rang, 1831) signalée récemment des serres du Jardin botanique de Lyon par Audibert (2010) ou *Rumina saharica* Pallary, 1901

mentionnée par Mienis (2008) d'un lot, sans indication de date, provenant de Menton.

Nous appliquons le traitement suivant aux espèces signalées comme d'occurrence « incertaine » ou « à vérifier » par Falkner *et al.* (2002): (1) les espèces correspondant à des populations clairement localisées mais dont l'identification est douteuse sont conservées (taxons ici qualifiés de « douteux ») [*Deroceras sardum*, *Moitessieria ollerii*, *Morlina glabra harlei*, *Solatopupa pallida*, *Zonitoides jaccetanicus*]; (2) les espèces dont l'occurrence en France n'est étayée par aucun spécimen connu sont exclues [*Arion flagellus* Collinge, 1893, *Arion owenii* Davies, 1979, *Geomalacus maculosus* Allman, 1843, *Limacus maculatus* (Kaleniczenko, 1851)].

Enfin, la bibliographie présentée ici diffère de celle de Falkner *et al.* (2002) puisqu'il s'agit uniquement des références utilisées dans le présent article et non d'une bibliographie exhaustive portant sur la faune de France.

Présentation des taxons et classification supra-générique

La présentation de la Liste de référence 2010 diffère de celle de 2002 notamment sur le choix de Falkner *et al.* (2002) de classer les noms d'espèces dans un ordre qui ne soit pas purement conventionnel, mais qui reflète une certaine conception des affinités entre les espèces. Nous suivons la recommandation de Davis (2004) qui souligne qu'une liste de référence ne devrait pas être le véhicule d'une quelconque reconstruction de l'histoire évolutive des espèces et nous présentons les espèces par ordre alphabétique. De même, l'ordre alphabétique est utilisé pour classer les familles au sein des super-familles.

Nous avons suivi Bouchet & Rocroi (2005) pour la classification supra-générique des gastéropodes et Bieler *et al.* (2010) pour celle des bivalves. Nous n'avons pas jugé opportun d'explicitier chaque différence de traitement taxonomique entre ces auteurs et ceux de la Liste de référence 2002 et nous renvoyons le lecteur à Bouchet & Rocroi (2005) et Bieler *et al.* (2010) pour des informations détaillées concernant les changements opérés depuis 2002.

Corpus bibliographique

La bibliographie sur laquelle cette liste est basée représente plus de 200 articles publiés entre 2001 et le 31 décembre 2010. En plus des opinions de la Commission internationale de nomenclature zoologique, les publications – valides au sens du Code – qui sont retenues ici font référence à un nom scientifique latin complet appliqué à des spécimens provenant de localités identifiées (département, commune ou coordonnées géographiques).

Enregistrement des actes nomenclatureaux, taxonomiques et données nouvelles

Dans la présente liste, les changements par rapport à la Liste de référence 2002 renvoient systématiquement à une note faisant référence aux publications concernées. Toutefois, parmi l'ensemble des actes taxonomiques réalisés dans la littérature, certains n'ont pas été repris notamment pour les taxons où les opinions d'auteur sont divergentes et/ou dans le cadre de révisions taxonomiques partielles. Dans tous ces cas, plutôt que de faire le choix arbitraire de suivre la dernière publication en date ou de réaliser une application nouvelle de nom, nous avons suivi le principe de conservation et maintenu le nom inscrit dans la liste 2002.

Pour chaque taxon terminal, nous indiquons par une lettre son statut pour la France : endémique [e], subendémique [s] (taxon dont la majeure partie de l'aire de répartition est en France), endémique éteint [ex], disparu de France [di], douteux [d], introduit [i] ou cryptogène [c]. Si aucun statut n'est indiqué, le taxon est indigène.

Une présentation synoptique de l'ensemble des modifications et nouveautés (taxons nouveaux, synonymies, changements de genre, etc.), par rapport à la Liste 2002, est également présentée en annexe.

Noms scientifiques français

La réactualisation de la liste des espèces de la faune de France est l'occasion de mettre à jour la liste de leurs noms scientifiques français (Fontaine *et al.* 2010). Nous donnons donc en regard de chaque taxon terminal son nom français de référence. La méthodologie suivie pour l'élaboration des nouveaux noms français est celle proposée par Fontaine *et al.* (2010). Dans un souci de stabilité de la nomenclature française, lorsque le changement de nom scientifique est dû uniquement à un rétablissement nomenclatural et ne concerne pas les conceptions taxonomiques, les noms français suivent les spécimens et non les noms scientifiques. Pour exemple, *Hydrobia acuta* qui a pour nom français Hydrobie méditerranéenne dans la précédente liste doit maintenant porter le nom *Ecrobia vitrea*. Par conséquent, c'est donc à *Ecrobia vitrea* qu'est aujourd'hui attaché le nom d'Hydrobie méditerranéenne.

Tous les noms ont été créés par les auteurs de la présente liste, à l'exception de ceux appliqués aux espèces décrites depuis 2002 par Henri Girardi, pour lesquelles ce dernier a donné, dans le cadre de cet article, des noms français.

Tableau 1 – Diversité des mollusques continentaux de France (nombre de taxons terminaux).

	(sub)endémiques	Taux d'endémisme	Eteintes / disparues	Total indigène	Cryptogènes	Introduites
Terrestres	130	29%	5	454	9	15
dont limaces *	16 (12%)	28%	1	58 (13%)	2	4
Aquatiques	187	65%	2	288	1	17
dont Bivalves	16 (9%)	32%	0	50 (17%)	0	6
Total	317	43%	7	742	10	32
Hydrobies s.l. **	168	87%	1	194	1	2
Hygromiidae	23	29%	2	78	1	3
Clausiliidae	12	27%	1	44		3
Helicidae	25	57%		44	3	3
Oxychilidae	12	34%		35		
Chondrinidae	15	44%		34		1
Unionidae	15	63%		24		1
Autres familles	47	16%	3	289	5	19

* Agriolimacidae, Arionidae Boettgerillidae, Limacidae, Milacidae, Onchidiidae, Parmacellidae et Testacellidae

** Amnicolidae, Assimineidae, Cochliopidae, Hydrobiidae et Moitessieriidae

Tableau 2 – Evolutions depuis la Liste de Référence 2002.

	Liste de référence 2002 *	Ajouts	Retraits	Liste de Référence 2010
Espèces	631	83	19	695
Taxons terminaux	710	94	20	784

* ne sont pas comptabilisées ici les 28 espèces et 6 sous-espèces désignées par "sp." ou "ssp." par Falkner *et al.* (2002) ainsi que *Monacha cf. parumcincta*. De plus, après contrôle, le chiffre mentionné dans la CL2002 de 747 taxa terminaux doit être réévalué à 745.

Résultats - Discussion

La faune de France en 2010 - bilan des changements depuis 2002

L'actualisation de la Liste de référence 2002 ajoute 93 taxons terminaux dont 61 nouveaux pour la science, alors que 20 ont été mis en synonymie ou retirés de la faune de France. La malacofaune continentale française compte donc à ce jour 783 taxons terminaux (pour 710 en 2002) dont 695 espèces (pour 631 en 2002). Parmi les taxons terminaux indigènes, 43% sont endémiques ou subendémiques à notre territoire. En quelques neuf ans, la malacofaune continentale connue de France a donc augmenté de plus de 10% (Tableaux 1 et 2). Deux espèces sont considérées éteintes (*Belgrandia varica* et *Parmacella gervaisii*) et cinq espèces ou sous-espèces disparues de France (*Bulinus truncatus contortus*, *Charpentieria dyodon thomasiana*, *Helicopsis striata striata*, *Perforatella bidentata* et *Vertigo genesii*). Alors que certains taxons n'ont jamais été récoltés vivants (par exemple *Acicula douctouyrensis* et près de la moitié des taxons stygobiontes) ou n'ont pas été collectés depuis une centaine d'années (par exemple *Vallonia declivis*), nous estimons qu'il est prématuré de les déclarer éteints ou disparus tant que des prospections supplémentaires n'ont pas été effectuées.

Sur l'ensemble de ces nouveautés taxonomiques, 65% sont des descriptions de taxons nouveaux pour la science. Le reste des nouveautés est réparti en nouvelles citations d'occurrences (13%) et (re)validation d'espèces ou de sous-espèces nominales (22%, Figure 1). Entre 2001 et 2010, onze auteurs ont publié les descriptions de 50 espèces

dans six revues. Par comparaison, entre 1991 et 2000, 25 descriptions ont été réalisées par dix auteurs à travers cinq revues.

Néanmoins, les nouvelles connaissances ne touchent pas de manière homogène, et de loin, tous les groupes de mollusques. En effet, les hydrobies *sensu lato* (Amnicolidae, Hydrobiidae et Moitessieriidae) représentent près de 67% des changements opérés depuis 2002, dont 45 espèces

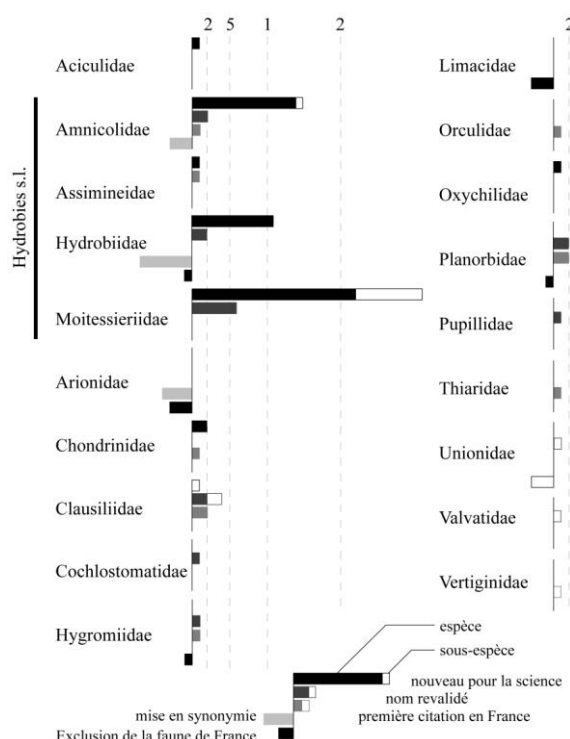


Figure 1 – Distribution des changements opérés depuis 2002 par famille et par catégorie.

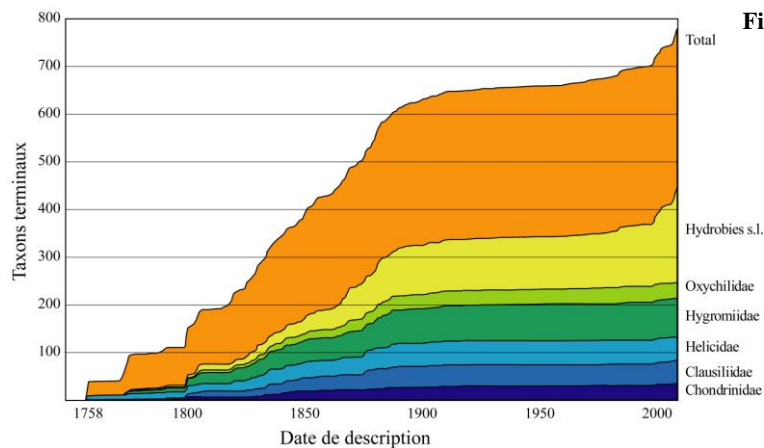


Figure 2 – Evolution du nombre de taxons actuellement considérés comme valides pour la faune de France par famille.

nouvelles et cinq genres nouveaux pour la science, majoritairement décrits comme des espèces ou genres micro-endémiques (28 espèces décrites d'une seule localité). Globalement, dans cette mise à jour, plus d'une espèce nouvelle sur deux est une hydrobie.

Rythme des descriptions

Le rythme de description des taxons actuellement considérés comme valides est illustré par la figure 2. L'essor des descriptions commence dès 1758, avec trois marches importantes correspondant aux travaux de Linné (1758), O.F. Müller (1774) et Draparnaud (début 19^{ème} siècle). A partir de 1820 commence une activité taxonomique très soutenue qui durera jusqu'à la fin du 19^{ème} siècle avec un rythme de description de six espèces, actuellement reconnues comme valides, par an. Il s'agit notamment des travaux impressionnants de Dupuy (1847-1852), de Moquin-Tandon (1855-1856), puis de Bourguignat et de sa très critiquée « Nouvelle Ecole » (Locard, Paladilhe, Fagot, Mabille, Caziot, etc.). A cette époque, la malacologie est divisée en deux camps, l'un, institutionnel, avec le Muséum et le *Journal de Conchyliologie*, l'autre associatif qui effectue la majeure partie des descriptions dans ses propres revues. Si bon nombre des descriptions d'espèces valides sont redevables à la Nouvelle Ecole, il faut considérer l'énorme déchet produit. En effet, à l'issue des derniers travaux de Locard, la faune de France est riche de 1850 espèces décrites (Bouchet 2002) dont seulement 630 sont actuellement reconnues comme valides. Or, au sein de ces dernières, près de 400 ont été décrites avant l'essor de la Nouvelle Ecole.

Ces excès sont tels que pendant près d'un siècle, le rythme des descriptions est pratiquement nul. La malacologie semblant occupée à « digérer » cette abondante littérature, avec notamment le travail de Germain (1930-1931) qui synonymise une grande partie des taxons décrits par la Nouvelle Ecole.

A partir de 1999, on assiste à un renouveau de la taxonomie descriptive en France avec en moyenne sept espèces ou sous-espèces nouvelles par an,

principalement dans le groupe des Hydrobies *sensu lato*. Cette prépondérance des hydrobies est peu surprenante, puisque ce groupe est documenté pour être le plus diversifié parmi les gastéropodes aquatiques (Strong *et al.* 2008) avec plus de 2000 espèces décrites et 5000 espèces estimées dans le monde. Par ailleurs, de nombreuses espèces sont inféodées aux eaux souterraines (Bole & Velkovrh 1986), des milieux particulièrement difficiles d'accès qui attirent aujourd'hui un nombre croissant de taxonomistes. Résultat de ce nouvel engouement, plus de 50% des espèces d'hydrobies récemment décrites de France sont souterraines. Ce résultat doit cependant être modéré par le fait que le travail de révision par d'autres auteurs, avec d'éventuelles mises en synonymie, n'a pas encore porté sur ces travaux récents.

Aspects juridiques et conservation

L'évolution des connaissances en systématique et les modifications de la nomenclature qui en découlent posent immédiatement le problème de l'héritage de statuts attachés à ces noms : statuts de menace de la Liste Rouge de l'UICN (www.redlist.org), listes ZNIEFF d'espèces patrimoniales et surtout listes d'espèces protégées (Bouchet 2002). Ces dernières peuvent avoir d'importantes incidences dans la vie publique (aménagement du territoire, plan de gestion des habitats naturels, etc.), avec notamment des impacts financiers.

Si une liste de référence ne peut résoudre ce type de problématique qui touche à l'interprétation du droit français, elle fournit l'historique et la nature des changements opérés sur les taxons concernés et doit servir de base à la constitution de listes d'espèces protégées.

L'héritage du statut d'espèce protégée ne pose pas toujours problème. Lorsqu'une espèce protégée change de nom (nouvelle attribution générique par exemple), il semble trivial de supposer que l'espèce est toujours protégée, même si le nom valide n'est pas celui cité dans le texte de loi. A ce titre, les noms scientifiques français prennent leur importance lorsqu'ils sont cités dans les textes juridiques, car ils

restent stables par rapport aux espèces biologiques. Pour exemple, le Lézard vert reste protégé malgré son changement de nom de *Lacerta viridis* (Laurenti, 1768) en *Lacerta bilineata* Daudin, 1802, car son nom français est cité dans l'arrêté au même titre que le nom latin. Nous recommandons donc d'utiliser les noms français diffusés ci-dessous lors de la prochaine mise à jour de l'arrêté des mollusques protégés, dans la mesure où ils pourront aider à stabiliser les noms des espèces biologiques concernées.

Lorsqu'une espèce protégée est divisée en plusieurs taxons, les nouveaux taxons devraient bénéficier de cette protection, mais il apparaît nécessaire de les lister juridiquement. Mais si une espèce non protégée est mise en synonymie avec une espèce protégée, le statut d'espèce protégée s'étend-il aux deux populations (l'espèce qui n'était pas protégée peut être largement répandue)? Par exemple, *Bythinella bicarinata*, autrefois considérée comme espèce micro-endémique, est protégée intégralement par l'Arrêté du 23 avril 2007 (NOR: DEVN0752758A, JORF n°106 du 6 mai 2007 page 8089). Selon la présente liste, il faut maintenant regrouper sous ce nom trois autres taxons (*B. pujolensis*, *B. lalindei* et *B. moulinsii*) élargissant de facto la répartition de cette espèce. Le statut de protection de *Bythinella bicarinata* devrait donc être réévalué.

Conclusion

La France présente une malacofaune particulièrement riche et diversifiée. Les enjeux d'une liste de référence sont donc importants non seulement en termes de connaissances sur ce groupe complexe, mais aussi pour la conservation d'une faune remarquable pour laquelle la France a une responsabilité majeure dans le contexte européen.

La Liste de référence 2002 a parfois été mal accueillie parmi les malacologues français (voir par exemple Bertrand 2004d, Girardi 2009f : 51) et controversée par une partie de la communauté internationale (voir par exemple Davis 2004 et Bouchet 2006). Pourtant, elle a joué un rôle de refondation de la malacologie continentale française après près de 70 ans d'abandon. Depuis 2002, ce référentiel taxonomique a permis de poser des débats ciblés autour de groupes problématiques (hydrobies *sensu lato*, Limacidae par exemple) et de stabiliser pour les autres une nomenclature et une taxonomie longtemps fluctuantes. Par ailleurs, plusieurs listes et atlas régionaux (Brault & Gervais 2004, Cucherat & Demuynck 2006, Boulord *et al.* 2007, Pavon & Bertrand 2005, 2009, Audibert 2010) ont vu le jour sur la base de la taxonomie proposée par les auteurs de la Liste de référence 2002. Ces travaux et d'autres (Anderson 2005, Anderson 2008, Bank *et*

al. 2007, Glöer & Meier-Brook 2008) ont été l'occasion de valider et/ou d'invalider certaines des propositions de Falkner *et al.* (2002). C'est le fonctionnement normal de la science où les confrontations autour d'hypothèses conflictuelles font l'objet de débats publics via le processus de publication.

Par ailleurs, la Liste de référence 2002 a aussi permis l'élaboration de la liste de référence des noms scientifiques français par Fontaine *et al.* (2010), un nouvel outil – ici complété – qui a pour objectif de faciliter la communication auprès du grand public, des décideurs, des médias ou des naturalistes.

Indépendamment ou non de la Liste de référence 2002, nous assistons à un renouveau de la recherche en malacologie continentale française. Ainsi, le *Zoological Record* en ligne recense 340 publications sur les mollusques continentaux de la France métropolitaine entre 1994 et 2001, contre 468 pour la période post-Liste de référence 2002 (2002-2009). Cette mise à jour de la Liste de Référence s'inscrit dans cette dynamique et nous espérons qu'elle sera utile aux recherches sur les problèmes taxonomiques qui restent indéniablement à résoudre.

Remerciements – Nous remercions Ruud BANK pour nous avoir fourni une révision préliminaire de la faune de France, Philippe BOUCHET pour ses aides constantes sur les problèmes taxonomiques ou nomenclaturaux, Thierry BACKELJAU, Ruud BANK et Philippe BOUCHET pour leur relecture du manuscrit final ainsi que Robert COWIE pour sa correction de l'anglais.

Liste de référence des mollusques continentaux de France métropolitaine

Liste de référence annotée des groupes taxonomiques comprenant les gastéropodes stygobies et les Nâïades de France (extrait de Gargominy et al. 2011)

Embranchement Mollusca Cuvier, 1795 Classe Gastropoda Cuvier, 1795 Super-famille Rissooidea J.E. Gray, 1847 Famille Amnicolidae Tryon, 1863

Genre *Bythinella* Moquin-Tandon, 1856ⁱ

- e *Bythinella bouloti* Girardi, Bichain & Wienin, 2002ⁱⁱ Bythinelle de Castelbouc
- e *Bythinella eutrepha* (Paladilhe, 1867) Bythinelle du Lez
- e *Bythinella galerae* Girardi, Bichain & Wienin, 2002ⁱⁱⁱ Bythinelle de Monbrun
- e *Bythinella navacellensis* Prié & Bichain, 2009^{iv} Bythinelle de Navacelles
- e *Bythinella padiraci* Locard, 1903 Bythinelle de Padirac
- Bythinella pupoides* (Paladilhe, 1869)
- e *Bythinella pupoides phreaticola* Bernasconi, 1989 Bythinelle du Coberan
- (...)

Famille Hydrobiidae Stimpson, 1865

Genre *Avenionia* Nicolas, 1882

- e *Avenionia berenguieri* (Bourguignat, 1882) Hydrobie du puits d'Avignon
- e *Avenionia bourguignati* (Locard, 1883) Hydrobie de l'Aude
- e *Avenionia brevis* (Draparnaud, 1805) Hydrobie du Jura
- (...)

Genre *Fissuria* Boeters, 1981

- e *Fissuria boui* Boeters, 1981 Planhydrobie de la Durance
- (...)

Genre *Heraultiella* Bodon, Manganelli & Giusti, 2002^v

- e *Heraultiella exilis* (Paladilhe, 1867) Planhydrobie de l'Hérault
- (...)

Genre *Islamia* Radoman, 1974^{vi}

- e *Islamia bomangiana* Boeters & Falkner, 2003^{vii} Globhydrobie de l'Ardèche
- e *Islamia bourguignati* (T. Letourneux, 1869)^{viii} Globhydrobie de Pissotte
- e *Islamia emanuelei* Girardi, 2009^{ix} Globhydrobie de Savonnières
- e *Islamia germaini* Boeters & Falkner, 2003^x Globhydrobie du Jura
- s *Islamia minuta* (Draparnaud, 1805)
- e *Islamia minuta consolationis* (Bernasconi, 1985) Globhydrobie du Doubs
- s *Islamia minuta minuta* (Draparnaud, 1805) Petite globhydrobie
- e *Islamia moquiniana* (Dupuy, 1851) Globhydrobie commune
- e *Islamia spirata* (Bernasconi, 1985) Globhydrobie de Besançon

Genre *Istriana* Velkovrh, 1971

- e *Istriana falkneri* Boeters, 2000 Hydrobie de la Ramière
- (...)

Genre *Palacanthilhiopsis* Bernasconi, 1988

- e *Palacanthilhiopsis carolinae* Girardi, 2009^{xi} Hydrobie de Lirac
- e *Palacanthilhiopsis kuiperi* Girardi, 2009^{xii} Hydrobie des Borrays
- e *Palacanthilhiopsis margritae* Boeters & Falkner, 2003^{xiii} Hydrobie épineuse
- e *Palacanthilhiopsis vervierii* Bernasconi, 1988 Hydrobie de l'Ardèche
- (...)

Famille Moitessieriidae Bourguignat, 1863

Genre *Bythiospeum* Bourguignat, 1882^{xiv}

- e *Bythiospeum anglesianum* (Westerlund, 1890)^{xv} Bythiospée gardoise
- e *Bythiospeum articense* Bernasconi, 1985 Bythiospée de Nîmes
- e *Bythiospeum bourguignati* (Paladilhe, 1866) Bythiospée méridionale
- e *Bythiospeum bournense* Girardi, 2009^{xvi} Bythiospée de la Bourne
- e *Bythiospeum bressanum* Bernasconi, 1985 Bythiospée de la Bresse
- Bythiospeum charpyi* (Paladilhe, 1867)
 - Bythiospeum charpyi charpyi* (Paladilhe, 1867) Bythiospée du Jura
 - Bythiospeum charpyi giganteum* Bernasconi, 1969 Grande bythiospée
- e *Bythiospeum curtum* (Nicolas, 1891)^{xvii} Bythiospée courte
- e *Bythiospeum diaphanoides* Bernasconi, 1985 Bythiospée intermédiaire
- e *Bythiospeum diaphanum* (Michaud, 1831)
 - Bythiospeum diaphanum alpillense* Girardi, 2009^{xviii} Bythiospée des Alpilles
 - Bythiospeum diaphanum diaphanum* (Michaud, 1831) Bythiospée rhénane
 - Bythiospeum diaphanum fernetense* Girardi, 2009^{xix} Bythiospée de Fernet
 - Bythiospeum diaphanum luberonense* Girardi, 2009^{xx} Bythiospée du Luberon
 - Bythiospeum diaphanum meyrarguense* Girardi, 2009^{xxi} Bythiospée de Meyrargues
 - Bythiospeum diaphanum michaellense* Girardi, 2002^{xxii} Bythiospée du Vaucluse
 - Bythiospeum diaphanum montbrunense* Girardi & Bertrand, 2009^{xxiii} Bythiospée de Montbrun
 - Bythiospeum diaphanum regalonense* Girardi, 2009^{xxiv} Bythiospée du Régalon
 - Bythiospeum diaphanum sarriansense* Girardi, 2009^{xxv} Bythiospée de Sarrians
- e *Bythiospeum dorvani* Bernasconi, 1985 Bythiospée de la Chartreuse
- e *Bythiospeum drouetianum* (Clessin, 1882) Bythiospée de Châtillon-sur-Seine
- Bythiospeum francomontanum* Bernasconi, 1973 Bythiospée francomtoise
- e *Bythiospeum gardonense* Girardi, 2009^{xxvi} Bythiospée du Gardon
- e *Bythiospeum garnieri* (Sayn, 1889) Bythiospée de Combovin
- e *Bythiospeum klemmi* (Boeters, 1969) Petite bythiospée
- e *Bythiospeum michaudi* (Locard, 1882) Bythiospée de Lyon
- e *Bythiospeum moussonianum* (Paladilhe, 1869) Bythiospée de Saint-Amour
- e *Bythiospeum racovitzai* (Germain, 1911) Bythiospée de Baume-les-messieurs
- Bythiospeum rhenanum* (Lais, 1935)
 - Bythiospeum rhenanum rhenanum* (Lais, 1935) Bythiospée des rieds
- e *Bythiospeum terveri* (Locard, 1882) Bythiospée du Rhône

Genre *Corseria* Boeters & Falkner, 2009^{xxvii}

- e *Corseria corsica* (Bernasconi, 1994)^{xxviii} Moitessierie corse

Genre *Henrigirardia* Boeters & Falkner, 2003^{xxix}

- e *Henrigirardia wienini* (Girardi, 2001)^{xxx} Moitessierie trompette

Genre *Meyrargueria* Girardi, 2009^{xxxi}

- e *Meyrargueria rasini* (Girardi, 2004)^{xxxii} Bythiospée bulle

Genre *Moitessieria* Bourguignat, 1863

- e *Moitessieria bodoni* Girardi, 2009^{xxxiii} Moitessierie des Gillardes
- e *Moitessieria bourguignati* Coutagne, 1883 Moitessierie de Toulouse
- e *Moitessieria calloti* Girardi, 2004^{xxxiv} Moitessierie de l'Ardèche
- e *Moitessieria cocheti* Boeters & Falkner, 2003^{xxxv} Moitessierie de Labastide
- e *Moitessieria fontsaintei* Bertrand, 2001^{xxxvi} Moitessierie de Fontaines
- e *Moitessieria heideae* Boeters & Falkner, 2003^{xxxvii} Moitessierie gardoise
- e *Moitessieria juvenisanguis* Boeters & E. Gittenberger, 1980 Moitessierie du Roussillon
- e *Moitessieria locardi* Coutagne, 1883 Petite moitessierie
- e *Moitessieria magnanae* Girardi, 2009^{xxxviii} Moitessierie de Saint-Martin-de-Londres
- e *Moitessieria massoti* Bourguignat, 1863 Moitessierie de Tautavel
- e *Moitessieria nezi* Boeters & Bertrand, 2001^{xxxix} Moitessierie de Rébénacq
- d *Moitessieria ollerii* Altimira, 1960^{xl} Moitessierie catalane
- e *Moitessieria ouvezensis* Boeters & Falkner, 2009^{xli} Moitessierie de Sablet
- e *Moitessieria rhodani* Coutagne, 1883^{xlii} Moitessierie de Saint-Julien-les-Rosiers

- e *Moitessieria rolandiana* Bourguignat, 1863 Moitessierie commune
- e *Moitessieria simoniana* (Saint-Simon, 1848) Moitessierie de la Garonne

Genre *Paladilhia* Bourguignat, 1865

- e *Paladilhia conica* Paladilhe, 1867 Bythiospée du Lez
- e *Paladilhia gloeeri* Boeters & Falkner, 2003 ^{xliii} Bythiospée de l'Ardèche
- e *Paladilhia jamblussensis* Bertrand, 2004 ^{xliv} Bythiospée de Jamblusse
- e *Paladilhia moitessieri* Bourguignat, 1865 ^{xlv} Bythiospée de Mosson
- e *Paladilhia pleurotoma* Bourguignat, 1865 ^{xlvi} Bythiospée méridional
- e *Paladilhia roselloi* Girardi, 2004 ^{xlvii} Bythiospée de Sanilhac
- e *Paladilhia subconica* Girardi, 2009 ^{xlviii} Bythiospée de Font-Vert
- e *Paladilhia umbilicata* (Locard, 1902) Bythiospée de Mialet
- e *Paladilhia vernierensis* Girardi, 2009 ^{xlix} Bythiospée de Vernière

Genre *Palaospeum* Boeters, 1999

- e *Palaospeum bertrandi* Girardi, 2009 ⁱ Bythiospée de Bagnères-de-Bigorre
- Palaospeum bessoni* (Bernasconi, 1999)
- e *Palaospeum bessoni bessoni* (Bernasconi, 1999) Bythiospée d'Alçay
- e *Palaospeum bessoni rebenacqense* Boeters & Bertrand, 2001 ⁱⁱ Bythiospée de Rébenacq
- e *Palaospeum nanum* Boeters & Bertrand, 2001 ⁱⁱⁱ Bythiospée naine

Genre *Sorholia* Boeters & Falkner, 2009 ^{liii}

- e *Sorholia lescherae* (Boeters, 1981) Moitessierie décollée

Genre *Spiralix* Boeters, 1972

- e *Spiralix burgundina* (Locard, 1882) Moitessierie de la Côte-d'Or
- Spiralix collieri* (Nicolas, 1891) ^{liv} Moitessierie des Angles
- e *Spiralix hofmanni* Boeters & Falkner, 2003 ^{lv} Moitessierie de Trabuc
- e *Spiralix kuiperi* Boeters & Falkner, 2009 ^{lvi} Moitessierie auboise
- e *Spiralix ovidiensis* Girardi & Bertrand, 2009 ^{lvii} Moitessierie de l'Ouvève
- e *Spiralix puteana* (Coutagne, 1883) Moitessierie d'Avignon
- e *Spiralix rayi* (Locard, 1882) Moitessierie bourguignonne
- e *Spiralix thaisensis* Girardi, 2009 ^{lviii} Moitessierie de Thaïs
- e *Spiralix vitrea* (Draparnaud, 1801) Moitessierie de l'Ain

Embranchement Mollusca Cuvier, 1795
Classe Bivalvia Linnaeus, 1758
Ordre Unionida J.E. Gray, 1854
Super-famille Unionoidea Rafinesque, 1820
Famille Margaritiferidae Henderson, 1929 (1910)

Genre *Margaritifera* Schumacher, 1815

- Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793)^{lix} Grande mulette
Margaritifera margaritifera (Linnaeus, 1758)
e *Margaritifera margaritifera brunnea* (Bonhomme, 1840) Mulette du Massif Central
Margaritifera margaritifera margaritifera (Linnaeus, 1758) Mulette perlière

Famille Unionidae Rafinesque, 1820

Genre *Anodonta* Lamarck, 1799

- Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758)
Anodonta anatina anatina (Linnaeus, 1758) Anodonte des rivières
Anodonta cygnea (Linnaeus, 1758)
Anodonta cygnea cygnea (Linnaeus, 1758) Anodonte des étangs

Genre *Potomida* Swainson, 1840^{lx}

- Potomida littoralis* (Cuvier, 1798)^{lxi} Mulette des rivières

Genre *Pseudanodonta* Bourguignat, 1877

- Pseudanodonta complanata* (Rossmässler, 1835) Anodonte comprimée
e *Pseudanodonta complanata dorsuosa* (Drouët, 1881) Anodonte de la Saône
Pseudanodonta complanata elongata (Holandre, 1836) Anodonte de la Moselle
e *Pseudanodonta complanata gratelupeana* (Gassies, 1849) Anodonte de la Garonne
e *Pseudanodonta complanata ligerica* Bourguignat, 1880 Anodonte de la Loire

Genre *Sinanodonta* Modell, 1945

- i *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) Anodonte chinoise

Genre *Unio* Philipsson, 1788^{lxii}

- Unio crassus* Philipsson, 1788 Mulette épaisse
e *Unio crassus courtillieri* Hattemann, 1859 Mulette ligérienne
Unio crassus cytherea Küster, 1833 Mulette du Danube
s *Unio crassus nanus* Lamarck, 1819 Mulette franc-comtoise
Unio crassus riparius C. Pfeiffer, 1821 Mulette du Rhin
Unio mancus Lamarck, 1819 Mulette méridionale
s *Unio mancus aleronii* Companyo & Massot, 1845^{lxiii} Mulette catalane
s *Unio mancus bourgeticus* Bourguignat, 1882 Mulette du Bourget
e *Unio mancus brindosianus* de Folin & Bérillon, 1874 Mulette de Brindos
s *Unio mancus mancus* Lamarck, 1819 Mulette méridionale
e *Unio mancus moquinianus* Dupuy, 1843 Mulette pyrénéenne
e *Unio mancus requienii* Michaud, 1831 Mulette rhodanienne
Unio mancus turtonii Payraudeau, 1826 Mulette corse
Unio pictorum (Linnaeus, 1758) Mulette des peintres
e *Unio pictorum deshayesii* Michaud, 1831 Mulette bigoudaine
Unio pictorum pictorum (Linnaeus, 1758) Mulette des peintres
e *Unio pictorum platyrhynchoideus* Dupuy, 1849^{lxiv} Mulette landaise
e *Unio pictorum rostratus* Lamarck, 1819 Mulette de Lamarck
Unio tumidus Philipsson, 1788 Mulette enflée
Unio tumidus depressus (Donovan, 1802) Mulette septentrionale
e *Unio tumidus vinceleus* de Joannis, 1859 Mulette séquanaise

ⁱ *Bythinella*

Depuis la liste de référence de Falkner *et al.* (2002), la systématique des Bythinelles a été marquée par plusieurs avancées notables. La première, et non la moindre, est la mise en évidence au sein du groupe de plusieurs radiations évolutives ayant survécu aux épisodes glaciaires du Pléistocène (Benke *et al.* 2009, Wilke *et al.* 2010). La seconde est la proposition d'une approche méthodologique appliquée à la délimitation des espèces au sein de chaque radiation basée sur les concepts et outils de la taxonomie intégrative (Bichain *et al.* 2007a, Bichain *et al.* 2007b, Haase *et al.* 2007).

Cependant, la plupart des descriptions d'espèces dans ce genre depuis 10 ans et jusqu'aux plus récentes, se fondent uniquement sur des caractères conchyliologiques, caractères démontrés comme plastiques et souvent non-déterminés. La multitude du nombre d'espèces nominales, la faiblesse des descriptions anciennes et actuelles couplée à la difficulté de réfuter ou d'infirmer ces hypothèses primaires de délimitation expliquent l'état de profonde confusion dans lequel se trouve encore ce groupe.

Récemment, un certain nombre de remaniements taxonomiques a été proposé pour les espèces de la faune de France notamment par Bichain *et al.* (2007b, voir en particulier Table 2 page 936). Nous suivons les propositions de ces auteurs de mise en synonymie si et seulement si les topotypes ou spécimens du locus typicus (aire géographique citée dans la description originale) sont impliqués. En effet, le matériel topotypique permet de réduire l'ambiguïté sur l'application des noms. Dans les cas qui ne respectent pas ces contraintes, nous ne suivons pas les propositions de ces auteurs et maintenons comme taxonomiquement valides les espèces nominales concernées.

ⁱⁱ *Bythinella bouloti*

Espèce décrite par Girardi *et al.* (2002) du réseau karstique souterrain de Castelbouc en Lozère.

ⁱⁱⁱ *Bythinella galerae*

Espèce décrite par Girardi *et al.* (2002) du réseau karstique souterrain de Castelbouc en Lozère.

^{iv} *Bythinella navacellensis*

Bythinella navacellensis a été décrite par Prié & Bichain (2009) à partir de spécimens récoltés à l'exurgence de la Follatière (Gard, commune de Rogues).

De cette même localité, Girardi (2009k) signale qu'il a adressé au MNHN en juin 2002 des spécimens sous l'étiquette « *Bythinella vasseuri* ». Cet auteur précise dans son article : « nous nous abstenons provisoirement de donner une valeur taxonomique et une position systématique à cet hydrobiidae de la grotte de la Follatière. Cette brève note n'a pas d'autre prétention que de signaler la présence d'un nouveau gastéropode cavernicole pour la faune de française. Cette coquille a été nommée « *vasseuri* », en hommage à Frank Vasseur ». Selon l'article 16.1 du Code international de nomenclature zoologique, l'absence de déclaration d'intention explicite de description de nouveau taxa par Girardi (2009k) implique que le nom *Bythinella vasseuri* ne peut pas être retenu comme un nom nouveau pour la science et devient par conséquent indisponible au regard du Code.

Lors de l'établissement du sous-genre *Thibynella*, Boeters (2009: 60) y inclut « *B. vasseuri* » en faisant référence à Girardi (2009k). Cette utilisation du nom ne le valide pas.

Boeters (2009) et Girardi (2009k) désignent en réalité *Bythinella navacellensis*.

^v *Heraultiella*

Bodon *et al.* (2001) établissent le genre monotypique *Heraultia* (espèce-type *Valvata exilis* Paladilhe, 1867). Ce nom étant préoccupé par un genre de diptères, Bodon *et al.* (2002) proposent le nom de genre *Heraultiella*. C'est donc ce nom qui doit être utilisé pour l'espèce anciennement nommée *Arganiella exilis*.

^{vi} *Islamia*

Les *Islamia* de la faune de France sont regroupées sous le nom *Neohoratia* Schütt, 1961 par Falkner *et al.* (2002). Toutefois, Bodon *et al.* (2001) révisent le genre et regroupent les espèces de la faune de France sous le nom *Islamia* Radoman, 1974. Kadolsky (2008) propose d'utiliser le nom *Globuliana* Paladilhe, 1866 en se basant sur l'antériorité du nom et pour éviter « the insensitivity inherent of the choice of the name *Islamia* by Radoman ». Ce choix nomenclatural est en désaccord avec l'article 23.9.1 du code : *Islamia* a été utilisé plus de 25 fois dans les 50 dernières années et *Globuliana* n'a pas été utilisé comme valide après 1899 (Bouchet, comm. pers.). *Islamia* doit donc être conservé comme nom valide.

vii ***Islamia bomangiana***

Espèce décrite par Boeters & Falkner (2003) du département de l'Ardèche à la source de l'Aiguille près de Serre-de-Torre.

viii ***Islamia bourguignati***

Bernasconi (2001) a examiné un lot de cette espèce de la localité-type (Fontaine du Moulin Gachet, Vendée) et conclut à sa synonymie avec ce qu'il appelle "*Neohoratia globulina* (Paladilhe, 1866)", c'est-à-dire aujourd'hui *Islamia moquiniana* (voir Falkner *et al.* 2002: note 74). Boeters & Falkner (2003) redécrivent *Islamia moquiniana* et, par comparaison avec les syntypes d'*Islamia bourguignati*, revalident cette espèce sur la base de caractères conchyliologiques.

ix ***Islamia emanuelei***

Espèce décrite par Girardi (2009c) du département de l'Indre-et-Loire des grottes pétrifiantes de Savonnières.

x ***Islamia germaini* Boeters & Falkner, 2003**

Espèce décrite par Boeters & Falkner (2003) du département du Jura à la source de la Grozonne près de Grozon.

xi ***Palacanthilhiopsis carolinae***

Espèce décrite par Girardi (2009d) du département du Gard de la source du Nizon à Lirac. Cette espèce, ainsi que *P. kuiperi*, figurent dans la liste des espèces déterminantes pour la désignation des Zones Naturelles d'Intérêt Ecologique Faunistique et Floristique (ZNIEFF) en Languedoc-Roussillon (Bertrand 2004d) sous les noms respectifs « *P. carolinae* Girardi, 2004 » et « *P. kuiperi* Girardi, 2004 ». La date de description donnée par Bertrand (2004d) dans ce texte qui peut avoir une portée juridique indirecte est bien sûr erronée puisque les descriptions n'ont été publiées que cinq ans plus tard. Pour la première espèce, le nom choisi par l'auteur de la description est *P. carolinae* et non *P. carolineae*. Par ailleurs, Girardi (2009) écrit parfois le nom du genre « *Palacanthilhiopsis* ». La véritable orthographe du nom du genre décrit par Bernasconi (1988) est « *Palacanthilhiopsis* », qui fait référence à l'épine présente sur l'opercule caractéristique du genre.

xii ***Palacanthilhiopsis kuiperi***

Espèce décrite par Girardi (2009j) du département du Vaucluse de la source des Vaudois au hameau des Borrys sur la commune de Méridol.

xiii ***Palacanthilhiopsis margritae***

Espèce décrite par Boeters & Falkner (2003) du département de l'Ardèche à Font-Méjanne près de Saint-Alban-sous-Sampzon, qui se distingue de *P. vervierii* par peu de caractères conchyliologiques ; cependant Girardi (2009l) propose des descripteurs biométriques permettant de séparer les deux espèces.

xiv ***Bythiospeum***

Ce genre est attribué par Falkner *et al.* (2002) à la famille des Hydrobiidae. Toutefois, Wilke *et al.* (2001) attribuent le genre *Bythiospeum* à la famille des Moitessieriidae sur la base d'une étude phylogénétique fondée sur des caractères moléculaires.

xv ***Bythiospeum anglesianum***

Espèce endémique du Gard revalidée par Boeters & Falkner (2009).

xvi ***Bythiospeum bournense***

Espèce nouvelle décrite par Girardi (2009e) du département de la Drôme dans la grotte de Thaïs à Saint-Nazaire-en-Royan.

xvii ***Bythiospeum curtum***

Espèce endémique du Gard revalidée par Boeters & Falkner (2009).

xviii ***Bythiospeum diaphanum alpillense***

Sous-espèce décrite par Girardi (2009f) du département des Bouches-du-Rhône du tunnel d'adduction d'eau du Rousty à Saint-Etienne-du-Grès.

^{xix} ***Bythiospeum diaphanum fernetense***

Sous-espèce décrite par Girardi (2009g) du département de la Drôme de la résurgence temporaire de Fernet à Chamaloc.

^{xx} ***Bythiospeum diaphanum luberonense***

Sous-espèce décrite par Girardi (2009f) du département du Vaucluse de la source Bonne Fontaine à Mérindol.

^{xxi} ***Bythiospeum diaphanum meyrarguense***

Sous-espèce décrite par Girardi (2009f) du département des Bouches-du-Rhône dans la source temporaire de la Foux à Meyrargues.

^{xxii} ***Bythiospeum diaphanum michaellense***

Après sa description par Girardi (2002a), ce taxon a fait l'objet d'un erratum par Girardi (2009h) afin de changer l'épithète sous-spécifique "*michaellensis*" en "*michaelleae*". En vertu des articles 32.5.1 et 33.2 (en particulier 33.2.3) du Code international de nomenclature zoologique, cette correction n'est pas valide. *B. d. michaelleae* est donc synonyme objectif de *B. d. michaellensis*. Par contre, *Bythiospeum* étant neutre, le nom spécifique est *michaellense*.

^{xxiii} ***Bythiospeum diaphanum montbrunense***

Sous-espèce décrite par Girardi & Bertrand (2009b) du département de la Drôme à Montbrun-les-Bains.

^{xxiv} ***Bythiospeum diaphanum regalonense***

Sous-espèce décrite par Girardi (2009f) du département du Vaucluse dans une source temporaire des gorges de Régalon sur la commune de Cheval-Blanc.

^{xxv} ***Bythiospeum diaphanum sarriansense***

Sous-espèce décrite par Girardi (2009g) du département du Vaucluse dans la source du château de Tourreau à Sarrians.

^{xxvi} ***Bythiospeum gardonense***

Espèce décrite par Girardi (2009p) du département du Gard à Collias et ses environs. Cette espèce figure dans la liste des espèces déterminantes, validée CSRPN, pour la désignation des ZNIEFF en Languedoc-Roussillon (Bertrand 2004d) sous le nom *B. gardonnensis* Girardi 2004. Le nom et la date de description données par Bertrand (2004d) dans ce texte qui peut avoir une portée juridique sont erronés puisque la description a été publiée sous le nom *B. gardonense* seulement cinq ans plus tard.

^{xxvii} ***Corseria***

Genre monotypique (espèce-type *Moitessieria corsica* Bernasconi, 1994) établi par Boeters & Falkner (2009).

^{xxviii} ***Corseria corsica***

Sur proposition de Boeters, Falkner *et al.* (2002) placent *Moitessieria corsica* dans le genre *Spiralix*. Par la suite, Boeters & Falkner (2009) établissent pour elle le genre monospécifique *Corseria*.

^{xxix} ***Henrigirardia***

Genre monotypique (espèce-type *Moitessieria wienini* Girardi, 2001) établi par Boeters & Falkner (2003).

^{xxx} ***Henrigirardia wienini***

Espèce décrite initialement dans le genre *Moitessieria* par Girardi (2001) du réseau des Fontenilles (commune de Puéchabon, Hérault), mais révisée par Boeters & Falkner (2003) qui établissent un nouveau genre monotypique pour cette espèce.

^{xxx}***Meyrargueria***

Girardi (2009o) établit le nouveau genre monotypique *Meyrargueria* sur la base des caractères conchyliologiques particuliers de *Bythiospeum rasini* Girardi, 2004. Puisque le genre *Meyrargueria* ne semble différer du genre *Bythiospeum* que par peu de caractères, il paraît plus parcimonieux de l'attribuer, en suivant Wilke *et al.* (2001), à la famille des Moitessieriidae.

^{xxxii}***Meyrargueria rasini***

Espèce décrite par Girardi (2004e) initialement dans le genre *Bythiospeum* de l'exsurgence de la Foux à Meyragues dans le département des Bouches-du-Rhône.

^{xxxiii}***Moitessieria bodoni***

Espèce décrite par Girardi (2009n) du département de l'Isère à la source karstique de la Grande Gaillarde à Pellafol.

^{xxxiv}***Moitessieria calloti***

Espèce décrite par Girardi (2004d) du département de l'Ardèche à Lagorce.

^{xxxv}***Moitessieria cocheti***

Cette espèce est décrite par Boeters & Falkner (2003) des gorges de l'Ardèche d'après un seul exemplaire. Des récoltes réalisées sur la station type par Bertrand (2004b) et Girardi (2004d) n'ont pas permis de la retrouver. En revanche, *Moitessieria locardi* y est récoltée en abondance et, selon ces auteurs, le type de *M. cocheti* serait en fait un juvénile de *M. locardi*. Dans l'attente d'une révision, nous maintenons ce nom parmi les espèces de la faune de France.

^{xxxvi}***Moitessieria fontsainteii***

Espèce décrite par Bertrand (2001) du département de l'Ariège dans la Source de Font-Sainte à Ustou.

^{xxxvii}***Moitessieria heideae***

Espèce décrite par Boeters & Falkner (2003) des Angles et d'Uzès dans le Gard et d'Avignon dans le Vaucluse.

^{xxxviii}***Moitessieria magnanae***

Espèce décrite par Girardi (2009b) du département de l'Hérault de la grotte des Châtaigniers à Saint-Martin-de-Londres.

^{xxxix}***Moitessieria nezi***

Espèce décrite par Boeters & Bertrand (2001) du département des Hautes-Pyrénées à Rébénacq. Cette espèce est décrite d'une seule coquille récoltée dans un dépôt de crue. L'espèce est actuellement connue de l'holotype et de cinq coquilles collectées ultérieurement par Bertrand (2004b).

^{xl}***Moitessieria olleri***

Cette espèce est décrite de Catalogne espagnole et n'a été récoltée que dans le bassin de l'Agly par Bertrand (2004b), qui lui-même met en doute l'appartenance de ses échantillons à *Moitessieria olleri*, considérant que le statut taxonomique de ces formes doit être précisé. Dans l'attente d'une révision du genre, nous maintenons ce nom parmi les espèces de la faune de France.

^{xli}***Moitessieria ouvezensis***

Espèce décrite par Boeters & Falkner (2009) du département du Vaucluse à Sablet.

^{xlii}***Moitessieria rhodani***

Espèce revalidée par Girardi (2004d) qui la distingue de *M. locardi* sur la base de la biométrie de la coquille (coquille plus petite et plus conique).

^{xliii}***Paladilhia gloeeri***

Espèce décrite par Boeters & Falkner (2003) du département de l'Ardèche à la source de l'Aiguille près de Serre-de-Torre.

^{xliv} *Paladilhia jamblussensis*

Espèce décrite par Bertrand (2004a) des eaux souterraines du Quercy.

^{xlv} *Paladilhia moitessieri*

Espèce revalidée par Bertrand (2004b: fig. 18) qui la considère « bien caractérisée conchyliologiquement ».

^{xlvi} *Paladilhia pleurotoma*

Synonyme de *Paladilhia pleurotoma* chez Falkner *et al.* (2002), *P. pontmartiniana* (Nicolas, 1891) est revalidée par Boeters & Falkner (2003) sur la base de l'examen du matériel de la collection Nicolas. Malgré tout, Fauna Europaea v2.3 la considère comme synonyme de *P. pleurotoma* sur la base de Girardi (2009j). Dans l'attente d'une clarification, nous conservons le *statu quo* par rapport à Falkner *et al.* (2002).

^{xlvii} *Paladilhia roselloi*

Espèce décrite par Girardi (2004b) des eaux souterraines de la Gardonnenque dans le Gard.

^{xlviii} *Paladilhia subconica*

Espèce décrite par Girardi (2009b) du département de l'Hérault de la grotte des Châtaigniers à Saint-Martin-de-Londres.

^{xlix} *Paladilhia vernierensis*

Espèce décrite par Girardi (2009m) du département du Gard de la grotte de Vernière, commune de Mialet.

¹ *Palaospeum bertrandi*

Espèce décrite par Girardi (2009l) du département des Hautes-Pyrénées à la source du Vallon-du-Salut à Bagnères-de-Bigorre.

^{li} *Palaospeum bessoni rebenacqense*

Sous espèce décrite par Boeters & Bertrand (2001) du département des Pyrénées-Atlantiques dans la vallée du Nez près de Rébénacq. *Palaospeum* étant neutre, il faut écrire *rebenacqense* et non *rebenacqensis*.

^{lii} *Palaospeum nanum*

Espèce décrite par Boeters & Bertrand (2001) du département des Pyrénées-Atlantiques dans la vallée du Nez près de Rébénacq. Elle n'est connue que de la localité-type. Bertrand (2004b) indique sa possible synonymie avec *P. bessoni rebenacqense* dont elle pourrait être une forme juvénile.

^{liii} *Sorholia*

Genre monotypique (espèce-type *Moitessieria lescherae* Boeters, 1981) établi par Boeters & Falkner (2009) sur la base de caractères anatomiques.

^{liv} *Spiralix collieri*

Boeters & Falkner (2003) valident *Lartetia collieri* Nicolas, 1891 qui était considérée comme un synonyme de *Spiralix puteana* (Coutagne, 1883).

^{lv} *Spiralix hofmanni*

Espèce décrite par Boeters & Falkner, 2003 du département du Gard de la grotte de Trabuc.

^{lvi} *Spiralix kuiperi*

Espèce décrite par Boeters & Falkner, 2009 du département de l'Aube près de Poligny.

^{lvii} *Spiralix ovidiensis*

Espèce décrite par Girardi & Bertrand (2009a) du département du Vaucluse de la rivière Ouvèze à Sablet.

^{lviii} *Spiralix thaisensis*

Espèce décrite par Girardi (2009e) du département de la Drôme de la grotte de Thaïs à Saint-Nazaire-en-Royan.

^{lix} ***Margaritifera auricularia***

Le genre *Pseudunio* a été établi par Haas (1910). L'espèce-type, *Unio sinuatus* Lamarck, 1819, est aujourd'hui considérée comme synonyme d'*U. auricularius*. *Pseudunio* a ensuite été synonymisé avec *Margaritana* (= *Margaritifera*) par Ortmann (1911). *Pseudunio* a été utilisé plus tard par Haas (1969) pour séparer *M. auricularia* et sa « variété » marocaine *M. auricularia marocana* (Pallary, 1918) des autres espèces du genre. Plus récemment, *Pseudunio* a de nouveau été utilisé comme genre par Smith (2001), Falkner *et al.* (2002) et Nienhuis (2003). Bien que Araujo *et al.* (2009b) montrent que *M. auricularia* et *M. marocana* sont deux espèces différentes qui forment un groupe monophylétique (ou clade) au sein de la famille des Margaritiferidae, ces auteurs recommandent, en l'absence d'une phylogénie claire sur la famille (voir par exemple Huff *et al.* 2004), de continuer à utiliser le genre *Margaritifera* (voir par exemple Araujo *et al.* 2009a, Graf & Cummings 2009).

^{lx} ***Potomida***

Altaba (2007) propose l'utilisation du nom *Psilunio* pour désigner *P. littoralis*, position démentie par Araujo (2008) que nous suivons ici. Graf & Cummings (2009) continuent également d'utiliser *Potomida*.

^{lxi} ***Potomida littoralis***

Araujo *et al.* (2009a: 28) considère les deux sous-espèces *Potomida littoralis cuneata* (Jacquemin, 1835) et *P. littoralis pianensis* (Boubée, 1833) comme synonymes de *P. littoralis*.

^{lxii} ***Unio***

Fauna Europaea v2.3 inclut dans la faune de France *Unio crassus batavus* (Maton & Rackett, 1807) et *U. tumidus tumidus* Philipsson, 1788 sans référence bibliographique. En attente d'éclaircissements sur la situation de ces deux sous-espèces nous ne les maintenons pas dans la présente liste de référence.

La structuration des communautés d'*Unio* en Europe de l'ouest, actuellement décrite comme une mosaïque de sous-espèces endémiques de bassin versants qui appartiennent à des espèces à vaste répartition, se base sur des critères morphologiques de la coquille loin d'être consensuels. Une approche de taxonomie intégrative est nécessaire et pourrait sérieusement remettre en cause cette vision actuelle. Par ailleurs, les rivières européennes ont subi de profondes modifications au cours du 20^{ème} siècle (dégradation généralisée de la qualité des cours d'eau et nouvelles connexions entre bassins versants *via* les nombreux canaux). Les « formes » observées actuellement ne correspondent donc pas nécessairement à celles qui étaient récoltées par les auteurs du 19^{ème} siècle. L'exemple d'*U. mancus aleronii* (voir note suivante) n'est certainement que le début de remaniements importants. Les résultats d'Araujo pour l'Espagne et les premières approches moléculaires pour les Unionidés de France (V. Prié, inédit) montrent que les divergences observées ne justifient pas le maintien des taxons subsécifiques tels que proposés par Falkner *et al.* (2002). Dans l'attente d'une synthèse sur les *Unio* de France, nous maintenons provisoirement ici le *statu quo*.

^{lxiii} ***Unio mancus aleronii***

Araujo *et al.* (2009a: 33), sur la base de données moléculaires inédites (« Toledo *et al.*, datos no publicados »), placent cette sous-espèce du bassin de la Garonne dans la synonymie d'*Unio mancus*. Compte tenu des connaissances actuelles sur les *Unio* (voir note précédente) et de la nécessité d'une étude plus poussée, en particulier sur ce taxon, il semble préférable de garder ici le nom *aleronii* afin de conserver une connaissance homogène sur ce groupe.

L'orthographe originale est bien *aleronii* (voir <http://biodiversitylibrary.org/page/3953237>) et non *aleroni* comme il est parfois écrit.

^{lxiv} ***Unio pictorum platyrhynchoideus***

Falkner *et al.* (2002: note 381) mentionnaient comme « *Unio pictorum ssp.* » des *Unio* très particuliers des lacs du sud des Landes au nord de Bayonne. Ils citent Haas (1969) qui reconnaît quant à lui une sous-espèce *U. pictorum platyrhynchoides* Dupuy, 1849 (localité-type : « étangs de Cazau, d'Aureillan, etc. dans les Landes »). Ils ne retiennent pas pour autant ce nom, considérant qu'il regroupe plusieurs taxons. Cependant, Fauna Europaea (v2.3, consulté le 31 décembre 2010) réhabilite ce nom sous la forme *U. pictorum platyrhynchoideus* Dupuy, 1849. En l'attente d'une étude plus poussée, nous incluons ce nom dans la présente liste afin de reconnaître à ces populations une valeur taxonomique.

I.1.3 Des noms pour communiquer : de l'importance du vernaculaire

Si la taxonomie obéit aujourd'hui à des règles nomenclaturales strictes, indispensables à la stabilité, elle est paradoxalement en perpétuel changement. Cette instabilité reflète l'évolution des connaissances et est donc constitutive des listes de références (Dubois, 1998). D'un point de vue pratique, d'une part les noms scientifiques sont difficiles d'accès pour le non biologiste (qui retiendra plus facilement le nom " Mulette Corse " qu'*Unio mancus turtonii* Payraudeau, 1826) ; d'autre part leur instabilité va à l'encontre de l'usage : un gestionnaire d'espace naturel ne fera pas nécessairement le lien entre *Arganiella exilis* (Paladilhe, 1867), qui figure dans la liste des espèces protégées, et *Heraultiella exilis* (Paladilhe, 1867), le nouveau nom introduit par Bodon *et al.* (2002), qu'il trouvera dans une liste d'espèces issue d'un inventaire ponctuel. Il est donc apparu nécessaire d'introduire des noms vernaculaires pour chacun des taxons de la liste de référence des mollusques continentaux de France, à l'instar de listes vernaculaires existantes pour d'autres groupes ou dans d'autres pays pour les mollusques. Nous donc avons formé un groupe de travail pour proposer un nom vernaculaire pour chacun des taxons présents dans la liste de référence, en se donnant des règles et un cadre permettant d'en assurer la pérennité (ARTICLE 2).

ARTICLE 2

Fontaine, B., Bichain, J.-M., Cucherat, X., Gargominy, O. & Prié, V. 2010. Les noms français des mollusques continentaux de France : Processus d'établissement d'une liste de référence. *Revue d'écologie (Terre Vie)*, 65(4): 1-25.

LES NOMS SCIENTIFIQUES FRANÇAIS
DES MOLLUSQUES CONTINENTAUX DE FRANCE :
PROCESSUS D'ÉTABLISSEMENT D'UNE LISTE DE RÉFÉRENCE

Benoît FONTAINE¹, Jean-Michel BICHAIN², Xavier CUCHERAT³, Olivier GARGOMINY⁴
& Vincent PRIÉ⁵

SUMMARY. — *French scientific names of continental molluscs of France: process for establishing a list of reference.* — In the biodiversity crisis context and with the increasing general awareness on this issue, conservation of small and poorly-known species is hampered by the fact they only have latine names. In order to communicate for biodiversity conservation, having French names is an advantage which is lacking in terrestrial and freshwater molluscs from France. To remedy this problem, we propose a list of French scientific names for this group, i.e. all species and subspecies known from France. We have listed existing names in legal documents, in usage and in the 18th and 19th centuries scientific literature. The resulting list being incomplete, we had to create new French names, following a series of recommendations adapted from similar works dealing with other taxonomic groups. We conclude by dealing with the issue of the legitimacy and validity of such names. The list of French scientific names is given as an appendix and is downloadable from internet.

RÉSUMÉ. — Dans le contexte de la crise de la biodiversité et de la prise de conscience par le grand public des enjeux environnementaux, la conservation des espèces petites et méconnues est handicapée par le fait que ces espèces ne peuvent être désignées que par leur nom latin. Dans une optique de communication pour la préservation de la biodiversité, disposer de nom français est un atout qui fait défaut pour les mollusques terrestres et d'eau douce de France. Pour remédier à cela, nous proposons une liste de noms scientifiques français pour ce groupe, et présentons les étapes qui ont permis l'établissement de cette liste. Les taxons concernés sont l'ensemble des espèces et sous-espèces de la faune de France, pour lesquelles nous avons recensé les noms existants, dans les textes légaux, dans l'usage et dans la littérature scientifique des XVIII^e et XIX^e siècles. La liste de noms obtenue étant insuffisante, nous avons dû créer de nouveaux noms, en suivant une série de recommandations adaptées de travaux similaires menés sur d'autres groupes. Enfin, nous concluons par la question de la validité et de la légitimité d'une telle liste. La liste des noms scientifiques français est fournie en annexe et téléchargeable sur internet.

L'actualité montre une nette prise de conscience des enjeux environnementaux : année de la biodiversité, Grenelle de l'Environnement, création de listes rouges nationale et régionales, sortie de films écologistes militants. Dans ce contexte, il paraît important de pouvoir facilement communiquer sur la biodiversité auprès de l'ensemble des acteurs de l'environnement, du

¹ CERSP UMR CNRS-MNHN 7204, Département Écologie et Gestion de la Biodiversité, Muséum national d'Histoire naturelle, CP 51, 55 rue Buffon. F-75005 Paris. E-mail : fontaine@mnhn.fr

² 4, boulevard de Lyon. F-67000 Strasbourg. E-mail : jean-michel.bichain@educagri.fr

³ Biotope Nord-Littoral, Avenue de l'Europe/ ZA de la Maie. F-62720 Rinxent. E-mail : xcucherat@biotope.fr

⁴ Service du Patrimoine Naturel, Département Écologie et Gestion de la Biodiversité, Muséum national d'Histoire naturelle, CP 51, 55 rue Buffon. F-75005 Paris. E-mail : gargo@mnhn.fr

⁵ Biotope Service R&D, 22, Bd Maréchal Foch, BP58. F-34140 Mèze. E-mail : vprie@biotope.fr

grand public aux décideurs en passant par les médias. Si l'on veut protéger *Xerosecta terverii* (Michaud, 1831), un escargot endémique d'une petite zone de la Côte d'Azur, et convaincre les maires des communes concernées du bien-fondé de l'opération, il semble probable que l'on aura davantage d'écoute en utilisant le terme Caragouille des Maures plutôt que *Xerosecta terverii* (Michaud, 1831). Employer des noms compréhensibles et appropriables, donc en français, est un avantage, surtout lorsque les espèces concernées sont peu charismatiques. Les 731 taxons terminaux de mollusques terrestres et d'eau douce de la faune de France continentale (MNHN, 2003-2009) sont des organismes souvent très petits, difficiles à voir et méconnus de la majorité du grand public et de la quasi-totalité des décideurs. Ils représentent pourtant de réels enjeux de conservation, en particulier du fait de leur fort taux d'endémisme. Pourtant, moins d'une dizaine possèdent un nom français non ambigu.

L'importance d'un système de noms français stabilisés a été reconnue pour de nombreux groupes : oiseaux du monde (Devillers *et al.*, 1993), libellules d'Europe (D'Aguilar & Domanget, 1998), mammifères du monde (Gunther, 2004). Les orthoptères de France (Luquet, 1993), les rhopalocères de France (Luquet, 1986) et les reptiles d'Europe (Lescure *et al.*, 1990) disposent aujourd'hui de noms français stabilisés. Pour les mollusques, la démarche a été reconnue comme importante dans divers pays : Ukraine (Sverlova, 2002), Autriche (Reischutz, 1998) ou Israël (Heller, 1998). La République Tchèque a franchi le pas en publiant une liste de noms tchèques (Pfleger, 1999), tout comme les Pays-Bas (De Bruyne *et al.*, 1994).

Afin de favoriser la conservation des mollusques continentaux de France, nous proposons donc une liste de référence de noms français, bi-univoque avec la nomenclature latine, c'est-à-dire qu'à chaque nom latin doit correspondre un et un seul nom français, pour l'ensemble de la faune de mollusques terrestres et d'eau douce de France. Cet article expose le processus d'élaboration de la liste des noms scientifiques français des mollusques de la faune de France : nous présentons successivement son domaine d'application, le recensement des noms existants susceptibles d'être repris, les recommandations pour la création de nouveaux noms et concluons par la question de la légitimité d'une telle liste.

Deux définitions sont nécessaires à ce stade :

— *Nom vernaculaire* : nom consacré par l'usage, qui peut n'être utilisé que localement et désigner des espèces différentes selon les régions, voire des groupes d'espèces (limace et loche sont des noms vernaculaires qui désignent indifféremment les espèces des divers genres de gastéropodes sans coquille).

— *Nom scientifique français* : nom en français, désignant une espèce ou une sous-espèce, de façon non équivoque. Chaque nom scientifique français correspond à une et une seule espèce ou sous-espèce, sur toute son aire de répartition, chaque taxon possède un et un seul nom scientifique français. Il est l'équivalent français du nom latin valide de ce taxon. C'est l'établissement d'une liste de noms scientifiques français qui est l'objet du présent article. Dans le texte ci-dessous, lorsqu'on parle de « noms français », il s'agit de noms scientifiques français.

DOMAINE D'APPLICATION DE LA LISTE DE NOMS SCIENTIFIQUES FRANÇAIS

Il existe des espèces ou sous-espèces, endémiques ou non, qui ont une forte valeur patrimoniale et représentent des enjeux forts de conservation. De fait, l'attribution d'un nom scientifique français permettrait une meilleure appropriation du taxon par le public et les institutions en charge de la gestion et de la protection de la nature. À l'inverse, d'autres espèces ou sous-espèces communes sont faciles à observer ou à identifier. Dans ce cas, le nom français permettrait aux naturalistes amateurs de les désigner et de mieux communiquer à leur sujet. Entre ces deux situations extrêmes, il existe tout un ensemble de taxons intermédiaires. Sans critère objectif permettant de sélectionner un sous-ensemble de la malacofaune française plutôt qu'un autre, il semble opportun d'attribuer un nom scientifique français à toutes les espèces et sous-espèces de mollusques de France métropolitaine.

La liste de référence utilisée dans le cadre de ce travail est celle de l'Inventaire National du Patrimoine Naturel au 31 décembre 2009 (MNHN, 2003-2009).

NOMS EXISTANTS

Dans le cas des oiseaux du monde, la Commission Internationale des Noms Français des Oiseaux (CINFO) (Devilleurs *et al.*, 1993) a recommandé de suivre l'usage établi pour la nomination des espèces. Ceci ne peut pas s'appliquer aux mollusques de France, puisque, à de rares exceptions près, il n'y a pas d'usage établi pour la désignation des taxons de la malacofaune continentale française. Les exceptions concernent tout d'abord les espèces faisant l'objet d'une législation : pour neuf espèces, des noms français ont été utilisés dans des textes de lois (Arrêté du 24 avril 1979 fixant la liste des escargots dont le ramassage et la cession à titre gratuit ou onéreux peuvent être interdits ou autorisés ; Arrêté du 23 avril 2007 fixant la liste des mollusques protégés sur l'ensemble du territoire). Ces noms sont à conserver, pour éviter toute confusion juridique et pour conserver l'usage. D'autre part, quelques espèces disposent d'un nom vernaculaire bien établi : lorsque ce nom est apparu plus de 10 000 fois dans une recherche sur internet, nous avons considéré qu'il était fixé par l'usage et qu'il fallait le conserver.

Enfin, pour d'autres espèces, des noms ont été proposés par des auteurs des XVIII^e et XIX^e siècles. Nous avons donc relevé les noms français attribués aux différentes espèces de France dans la littérature malacologique des XVIII^e et XIX^e siècles (Geoffroy, 1767 ; Draparnaud, 1801 ; Poirét, 1801 ; Draparnaud, 1805 ; Férussac & Deshayes, 1819-1851 ; Risso, 1826 ; Michaud, 1831 ; Du Boys, 1845 ; Gras, 1846 ; Dupuy, 1847-1852 ; Moquin-Tandon, 1855-1856 ; Fagot & Malafosse, 1876-1877). Ultérieurement, les malacologues tels que Bourguignat, Locard ou Germain n'utilisaient plus de noms français. Une grande partie des noms français rassemblés sont de simples traductions littérales du latin, comme l'annonce Dupuy (1847-1852) : « Toutes les fois que je ne traduis pas le nom latin d'une espèce par le nom français correspondant, c'est parce que cette espèce a déjà reçu un nom français consigné dans quelqu'un des ouvrages écrits sur cette matière ». Nous avons également relevé les noms régionaux cités par Rolland (1877) concernant douze espèces communes.

Au total, 833 noms français différents ont été relevés dans la littérature ancienne, avec leur explication ou leur origine géographique lorsqu'elle était donnée. Les ouvrages de Germain (1930b ; 1930a), Falkner *et al.* (2002) et Glöer (2002) ont été utilisés pour résoudre les problèmes de synonymie, ce qui a permis d'associer 756 de ces noms français à 298 espèces et sous-espèces valides. De nombreux taxons ont reçu plusieurs noms selon les auteurs et parfois plusieurs noms pour le même auteur. Par exemple, *Cepaea nemoralis* a reçu 16 noms différents,

QUELQUES EXEMPLES

Certains noms donnés par les auteurs anciens sont particulièrement amusants ou poétiques, par exemple :

– A propos d'*Eobania vermiculata*, Draparnaud (1801) explique que « [l'animal] se retire beaucoup dans l'intérieur de sa coquille ; de manière qu'on a de la peine à l'apercevoir quand il y est renfermé. C'est ce qui fait qu'à Montpellier les paysans donnent à cette espèce le nom de Mourguéta, ce qui veut dire Religieuse ».

– Les Succineidae à la coquille piriforme sont des ambrettes, probablement parce que l'ambrette est aussi une « petite poire qui a l'odeur d'ambre gris » (Lachiver, 1997).

– Les Pupillidae, Lauriidae, Chondrinidae, Vertiginidae et autres familles proches, chez lesquelles les espèces ont une coquille cylindrique ou ovoïde, ont souvent reçu le nom générique de *maillot*, ce que l'on comprend en recherchant la définition de ce terme dans l'Encyclopédie de Diderot et D'Alembert : « Maillot : couches & langes dont on enveloppe un enfant nouveau-né à la naissance et pendant la première année » (Diderot & D'Alembert, 1765).

– Geoffroy (1767) appelle *Merdigera obscura* Grain d'orge, ce qu'il justifie en écrivant : « Comme cette coquille est à peu près de la grosseur et de la longueur d'un grain d'orge, on a tiré de cette ressemblance le nom qu'elle porte ». Il existe également le Grain d'avoine *Chondrina avenacea*, le Maillot seigle *Abida secale*, le Maillot froment *Granaria frumentum* et le Maillot grain *Granopupa granum*.

– Comme toutes les clausilies, *Clausilia rugosa* a une coquille sénestre : « Sa forme lui a fait donner le nom de Nompaille (*sic*), ses volutes étant tournées dans un sens contraire à celui qui est ordinaire aux autres coquilles » (Geoffroy, 1767).

– Autre clausilie, *Cochlodina laminata* a été baptisée Unique de Genève car « autrefois ces coquilles gauches étaient regardées comme très-rares ; aussi leur avait-on donné le nom d'Uniques » (Draparnaud, 1801).

Helix pomatia 15 autres. Au total, 38 % de la faune de France a reçu un (ou plusieurs) nom(s) français. Enfin, certains noms français ont été utilisés pour plusieurs espèces : Hélice brillante est le nom de *Vitrea crystallina* (O.F. Müller, 1774) pour Draparnaud, celui de *Zonitoides nitidus* (O.F. Müller, 1774) pour Dupuy et celui d'*Aegopinella nitens* (Michaud, 1831) pour Michaud.

Dans la mesure du possible, ces noms ont été repris dans la liste proposée. Cependant, nous n'avons pas conservé ceux qui nous paraissaient inadéquats, puisqu'aucun d'entre eux n'a été consacré par l'usage.

RECOMMANDATIONS DÉFINIES POUR L'ATTRIBUTION DE NOMS SCIENTIFIQUES FRANÇAIS

Pour la majorité des espèces et sous-espèces de la faune de France, aucun nom français n'existait, il a donc fallu les créer. Nous nous sommes inspirés de travaux similaires concernant d'autres groupes et/ou réalisés dans d'autres langues (Devillers *et al.*, 1993 ; Christidis & Boles, 1994 ; Heller, 1998 ; Turgeon *et al.*, 1998 ; Wilson & Cole, 2000 ; Breene, 2003 ; Heller, manuscrit non publié) pour élaborer la série de recommandations suivante :

1. Chaque taxon terminal (espèce et sous-espèce) de la faune de France reçoit un unique nom français ; deux taxons différents ne peuvent avoir le même nom. Si une espèce est séparée en deux (splitting), l'espèce nominative conserve le nom scientifique français, et un nouveau nom est créé pour la seconde. Lorsqu'une espèce tombe en synonymie, son nom scientifique français est abandonné.

2. Les noms sont choisis en priorité dans le corpus existant, sauf s'ils ne respectent pas les recommandations 4 à 13. Dans le cas de la description d'une nouvelle espèce pour la faune de France métropolitaine, le nom scientifique français proposé a priorité. Par ailleurs, lorsqu'un nom français donné par un ancien auteur n'est pas adapté, en particulier dans le cas d'espèce nominale éponyme tombée en synonymie, il n'est pas repris et un nouveau nom est attribué en respectant les recommandations suivantes.

3. Les noms scientifiques français n'ont pas vocation à refléter la systématique supraspécifique et la nomenclature latine. Au contraire, il est important qu'ils restent stables lorsque l'évolution des connaissances oblige à modifier les noms latins. Par ailleurs, les noms français des sous-espèces sont construits comme ceux des espèces, l'objectif n'étant pas de mettre en avant leur caractère de sous-espèces.

4. Les noms scientifiques français sont composés d'un générique et d'un spécifique. Le générique est un terme permettant de désigner un ensemble d'espèces d'aspect similaire, tandis que le spécifique, accolé au générique, désigne une espèce ou une sous-espèce. Les génériques ne sont pas nécessairement analogues aux noms de taxons supraspécifiques (nom de genre en particulier). Ainsi, des génériques différents peuvent être attribués à des espèces de même genre (*Helix melanostoma* est nommé Hélice tapada, tandis qu'*Helix pomatia* est nommé Escargot de Bourgogne), ou des génériques identiques à des espèces de genres ou même de familles différents (par exemple les termes hélice et maillot).

5. Les noms (principalement des génériques) dont l'usage est établi, tels qu'Escargot de Bourgogne, planorbe, limnée, sont conservés.

6. Les noms sont formés de deux ou trois mots, exceptionnellement davantage, notamment s'ils font référence à un toponyme composé de plusieurs mots (par exemple Veloutée de la Grande Chartreuse pour *Trochulus phorochaetis* (Bourguignat, 1864)).

7. Les génériques peuvent être des noms de genre francisés : bythinelle pour *Bythinella*, clausilie pour *Clausilia*.

8. Éviter de se contenter de traduire littéralement les noms latins, à moins qu'ils ne soient informatifs. Par exemple, il n'est pas souhaitable que *Ponentina revelata* (Michaud, 1831) soit appelée Occidentale révélée. À l'inverse, *Oxychilus alliarius* (Miller, 1822) a été nommé Luisant aillé, puisque cette espèce dégage une forte odeur d'ail.

9. Les noms rappelant une origine géographique sont souvent souhaitables car ils permettent une appropriation des espèces. Cependant, ils doivent être réservés aux endémiques

ayant une répartition restreinte, dans une optique de conservation, par exemple Planhydrobie de l'Hérault pour *Heraultiella exilis* (Paladilhe, 1867).

10. Préférer les noms mettant en avant une caractéristique de l'espèce : morphologie, habitat, couleur, comportement, ressemblance avec d'autres espèces. Par exemple, le nom français Bulime tronqué a été proposé pour *Rumina decollata* (Linnaeus, 1758), parce qu'il s'agit de la seule espèce de la faune de France dont le sommet de la coquille est cassé chez les adultes.

11. Les noms métaphoriques ou originaux sont souhaitables. Par exemple, Hélice grimace pour *Isognomostoma isognomostomos* (Schröter, 1784).

12. Les noms issus de langues régionales tels qu'Escargot mourguéta pour *Eobania vermiculata* (O.F. Müller, 1774) sont recommandés, en particulier pour les taxons présents uniquement dans les régions concernées.

13. Les noms commémorant des personnes ne sont pas recommandés, puisqu'ils ne sont pas informatifs. Exceptionnellement, ils sont acceptables si la personne est connue de la communauté scientifique et si l'espèce n'a pas de caractéristique remarquable, par exemple Pisidie de Lamarck pour *Pisidium obtusale* (Lamarck, 1818).

CONCLUSION

Le choix d'un nom français unique pour chaque espèce soulève la question de sa légitimité et de son acceptation par l'ensemble de ses utilisateurs. Heller (1998) propose que les noms de mollusques soient créés par des malacologues, en coopération avec des linguistes, puis acceptés par une commission de terminologie composée de linguistes, de membres de l'académie et de spécialistes du domaine concerné. Nous pensons qu'avant l'académie, c'est l'usage qui doit légitimer une telle liste et que ce sont donc les utilisateurs potentiels qui les premiers doivent la valider. C'est pourquoi, par le biais de listes de discussion dédiées aux mollusques (Helicella, Mollusca et MalaCo) nous avons proposé aux utilisateurs potentiels d'examiner une liste préliminaire, de la critiquer et de faire des recommandations. Dix-huit personnes ont répondu positivement et ont donc reçu cette liste. Leurs remarques ont été prises en compte pour l'établissement de la liste finale. Nous considérons que la légitimité d'une telle liste est liée à la contribution apportée par ces utilisateurs potentiels, mais les auteurs du présent article restent cependant seuls responsables du choix final des noms.

A l'issue de ce travail de compilation de noms existants, de création de noms français nouveaux et de validation par des utilisateurs potentiels, 731 taxons se sont vu attribuer un nom français. Parmi ceux-ci, 92,6 % ont été créés, 5,7 % ont été repris dans la littérature, 1,6 % ont été consacrés par l'usage (textes légaux, diffusion internet) (Fig. 1). D'autre part, 49,2 % des noms indiquent l'origine géographique du taxon, 27,7 % reflètent son aspect (couleur, forme par exemple), 12,3 % ont un lien avec son habitat, 2,0 % rendent hommage à une personnalité, les 8,6 % restants ayant été choisis sur d'autres critères.

DIFFUSION

Afin d'assurer une utilisation la plus large possible, la liste en annexe du présent article est également téléchargeable gratuitement sur le site du bulletin de malacologie francophone MalaCo (<http://www.journal-malaco.fr>). Par ailleurs, les noms sont donnés sur le site de l'Inventaire National du Patrimoine Naturel (<http://inpn.mnhn.fr>).

REMERCIEMENTS

Merci à toutes les personnes ayant accepté d'examiner une liste provisoire et, le cas échéant, ayant proposé des modifications. C'est leur implication dans ce projet qui lui donne une légitimité : Cédric Audibert, Christophe Bernier, Alain Bertrand, Cyrille Blond, Henri Cap, Maryvonne Charrier, Pierre-Olivier Cochard, Gilbert Cochet, Margrit Falkner, Christian Goyaud, Nicolas Greff, Benoît Lecaplain, Jean-Yves Monnat, Daniel Pavon, Mary Seddon, Alain Thomas, Antoine Trarieux et Gregory Willems.

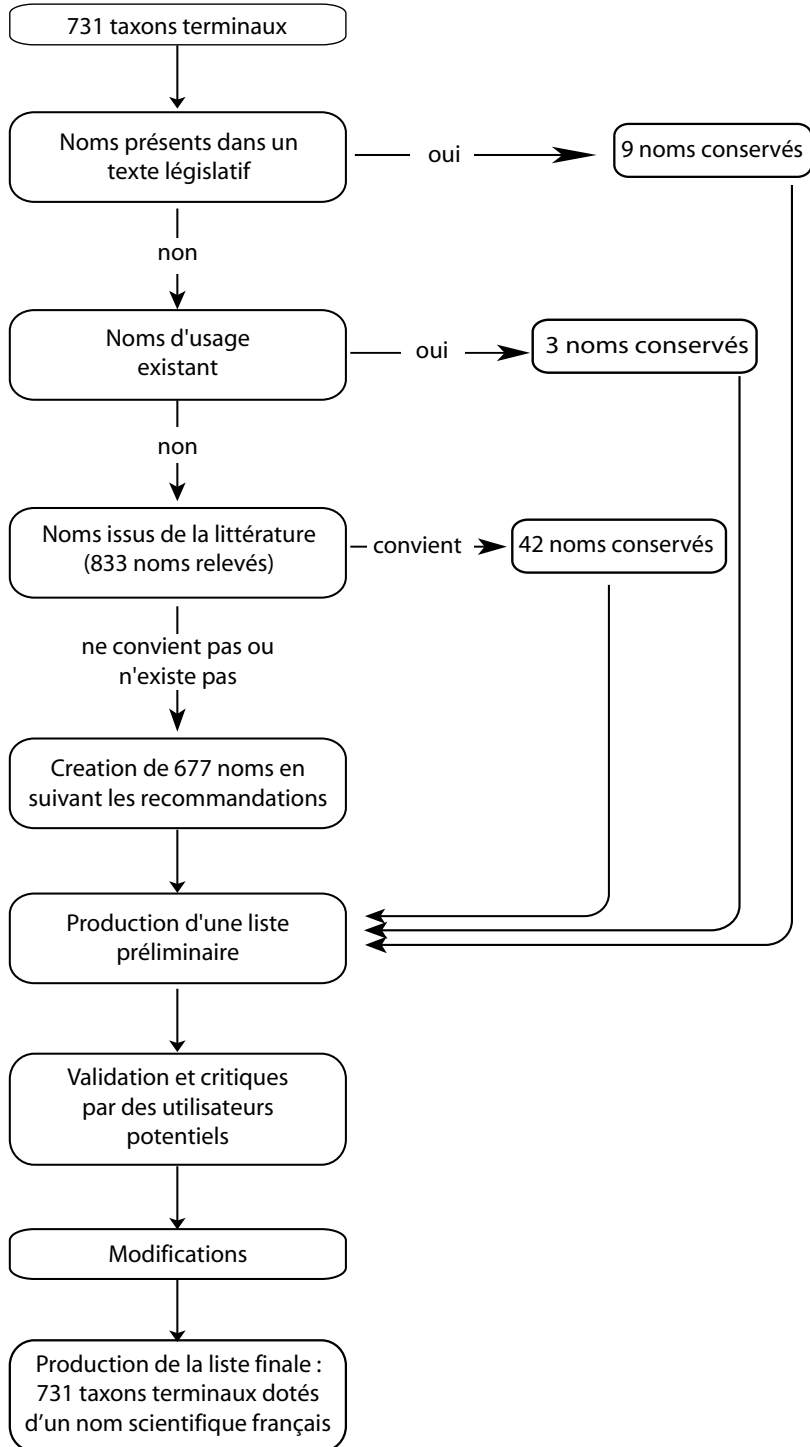


Figure 1. — Processus d'élaboration de la liste des noms scientifiques français des mollusques terrestres et d'eau douce de France.

RÉFÉRENCES

- BREENE, R.G. (2003). — *Common names of arachnids. Fifth edition.* The American Arachnological Society. Committee on Common Names of Arachnids.
- CHRISTIDIS, L. & BOLES, W.E. (1994). — *Taxonomy and species of birds of Australia and its territories.* Royal Australasian Ornithologists Union, Melbourne.
- D'AGUILAR, J. & DOMMANGET, J.-L. (1998). — *Guide des libellules d'Europe et d'Afrique du nord.* Guides du naturaliste. Delachaux et Niestlé, Lausanne, Paris.
- DE BRUYNE, R.H., BANK, R.A., ADEMA, J.P.H.M. & PERK, F.A. (1994). — *Nederlandse naamlijst van de weekdieren (Mollusca) van Nederland en België.* Nederlandse Malacologische Vereniging Leiden.
- DEVILLERS, P., OUELLET, H., BÉNITO-ESPINAL, E., BEUDELS, R., CRUON, R., DAVID, N., ERARD, C., GOSSELIN, M. & SEUTIN, G. (1993). — *Noms français des oiseaux du Monde.* MultiMondes Inc. et Chabaud, Sainte-Foy, Québec et Bayonne, France.
- DIDEROT, D. & D'ALEMBERT, J., [Eds]. (1765). — *Encyclopédie ou Dictionnaire raisonné des sciences, des arts et des métiers. Tome neuvième.* JU-MAM. Samuel Faulche, Neufchâtel.
- DRAPARNAUD, J.-P.-R. (1801). — *Tableau des Mollusques terrestres et fluviatiles de la France.* Renaud, Bossange, Masson et Besson, Montpellier et Paris.
- DRAPARNAUD, J.-P.-R. (1805). — *Histoire naturelle des Mollusques terrestres et fluviatiles de la France.* Ouvrage posthume. Levrault, Schoell et Cie, Paris.
- DU BOYS, A. (1845). — *La Grande Chartreuse, ou tableau historique et descriptif de ce monastère précédé d'une abrégée de Saint Bruno, fondateur de l'ordre des Chartreux.* Baratier frères et fils, Grenoble.
- DUPUY, D. (1847-1852). — *Histoire Naturelle des Mollusques terrestres et d'eau douce qui vivent en France. V.* Masson, Paris.
- FAGOT & MALAFOSSE (1876-1877). — *Catalogue des mollusques terrestres et fluviatiles observés dans le département de la Lozère.* Bulletin de la société d'histoire naturelle de Toulouse, onzième année.
- FALKNER, G., RIPKEN, T.E.J. & FALKNER, M. (2002). — *Mollusques continentaux de la France : liste de référence annotée et bibliographie.* Patrimoines Naturels Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. 52.
- FÉRUSSAC, A.E.J.P.F.D.A.D. & DESHAYES, G.-P. (1819-1851). — *Histoire naturelle générale et particulière des Mollusques terrestres et fluviatiles.* 4 vol. Paris.
- GEOFFROY, E.-L. (1767). — *Traité sommaire des coquilles tant fluviatiles que terrestres qui se trouvent aux environs de Paris.* J.B. Guil. Musier Fils, Paris.
- GERMAIN, L. (1930a). — *Mollusques terrestres et fluviatiles (deuxième partie).* Faune de France vol. 22. Lechevalier, Paris.
- GERMAIN, L. (1930b). — *Mollusques terrestres et fluviatiles (première partie).* Faune de France vol. 21. Lechevalier, Paris.
- GLÖER, P. (2002). — *Die Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas. Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung.* Die Tierwelt Deutschlands. Conchbooks 73.
- GRAS, A. (1846). — *Description des Mollusques fluviatiles et terrestres de la France et plus particulièrement du département de l'Isère.* Grenoble.
- GUNTHER, P. (2004). — *Mammifères du monde - Inventaire des noms scientifiques, français et anglais.* Editions Cade, Paris.
- HELLER, J. (1998). — Common names for mollusks. Pp 150 in : Bieler, R. & Mikkelsen, P.M. (eds), *Abstracts of the World Congress of malacology, Washington, D.C. 1998.* Unitas Malacologica, Chicago.
- HELLER, J. (manuscrit non publié). — *Vernacular names for mollusks : guidelines for creating a name system.*
- LACHIVER, M. (1997). — *Dictionnaire du monde rural - Les mots du passé.* Fayard, Paris.
- LESCURE, J., BOUR, R. & INEICH, I. (1990). — Les noms scientifiques français des reptiles d'Europe. *Bulletin de la Société herpétologique de France*, 54 : 23-54.
- LUQUET, G.C. (1986). — Les noms vernaculaires français des Rhopalocères d'Europe (Lepidoptera Rhopalocera). *Alexandria*, 14 (7) : 1-49.
- LUQUET, G.C. (1993). — Les noms vernaculaires français, néerlandais, allemands et anglais des orthoptères d'Europe occidentale (Orth. Ensifera et Caelifera). *Entomologica Gallica*, 4 : 97-124.
- MICHAUD, A.-L.-G. (1831). — *Complément de l'Histoire des Mollusques terrestres et fluviatiles de la France, de J.P.R. Draparnaud.* Lippman, Verdun.
- MNHN (2003-2009). — *Inventaire national du Patrimoine naturel.* <http://inpn.mnhn.fr>. Accessed 31 December 2009.
- MOQUIN-TANDON, A. (1855-1856). — *Histoire Naturelle des Mollusques Terrestres et Fluviatiles de France.* J.-B Baillière Paris 2 vol. + Atlas.
- PFLERGER, V. (1999). — *Ceské názvy živočichu III. Měkkysi (Mollusca).* Národní muzeum (zoologické oddělení), Praha.
- POIRET, J.L.M. (1801). — *Coquilles fluviatiles et terrestres observées dans le département de l'Aisne et aux environs de Paris.* Prodrome. Théophile Barrois, Paris, Soissons.
- REISCHUTZ, P.L. (1998). — Suggestion for German names of snails and mussel species found in Austria. *Nachrichtenblatt der Ersten Vorarlberger Malakologischen Gesellschaft*, 6 : 31-44.

- RISSO, A. (1826). — *Histoire naturelle des principales productions de l'Europe méridionale et particulièrement de celles des environs de Nice et des Alpes Maritimes, Tome quatrième*. Levrault, Paris.
- ROLLAND, E. (1877). — *Faune populaire de la France : noms vulgaires, dictons, proverbes, légendes, contes et superstitions. Tome III. Les reptiles, les poissons, les mollusques, les crustacés et les insectes*. Maisonneuve et cie, Paris.
- SVERLOVA, N.V. (2002). — On the necessity of creating the common system of national names for land molluscs. *Visnyk Zhytomyrskoho Pedahohichnoho Universytetu*, 10 : 37-40.
- TURGEON, D.D., QUINN, J., J. F., BOGAN, A.E., COAN, E.V., HOCHBERG, F.G., LYONS, W.G., MIKKELSEN, P.M., NEVES, R.J., ROPER, C.F.E., ROSENBERG, G., ROTH, B., SCHELTEMA, A., THOMPSON, F.G., VECCHIONE, M. & WILLIAMS, J.D. (1998). — *Common and scientific names of aquatic invertebrates from the United States and Canada : mollusks*. American Fisheries Society, Special Publication 26, Bethesda, Maryland.
- WILSON, D.E. & COLE, F.R. (2000). — *Common names of mammals of the world*. Smithsonian Institution, Washington, D.C.

I.2 HISTORIQUE ET MECANISMES DE LA CONSERVATION

I.2.1 La crise de la biodiversité – prise de conscience et historique des actions de conservation

Depuis l'apparition de la vie il y a plus de 3,5 milliards d'années, la terre a connu 5 grandes crises d'extinctions. La plupart des biologistes s'accordent aujourd'hui à considérer que nous vivons actuellement la sixième extinction, d'origine humaine cette fois (ex. Wake & Vredenburg 2008). Cette extinction de masse, aussi appelée extinction de l'Holocène, a vraisemblablement débuté dès le Pléistocène (Foreman 2004 ; Donlan *et al.* 2006) et s'est poursuivie et accentuée durant tout l'Holocène, touchant principalement les "grosses espèces" selon la plupart des auteurs, alors que le statut des " petites espèces " reste méconnu (Régnier *et al.* 2009).

L'IUCN considère aujourd'hui que près de 41% (30-56%) des amphibiens ; 35% (21-36%) des mammifères ; 13% (13-14%) des oiseaux sont menacés d'extinction (IUCN 2012). Les analyses menées récemment à l'échelle européenne montrent que 21% des taxons évalués sont menacés. Pour ce qui concerne la faune des mollusques de France, 13 % des espèces terrestres et 31% des espèces dulçaquicoles sont menacés à l'échelle européenne pour l'IUCN. Pour ces derniers, la proportion atteint 59% en retirant les espèces "data deficient".

I.2.1.1 Du constat...

La prise de conscience s'est faite en plusieurs étapes, essentiellement au cours du XX^e siècle, mais plusieurs auteurs historiques se sont inquiétés de l'influence que l'homme aurait pu avoir sur l'abondance ou sur la disparition d'espèces animales. Pline l'Ancien s'étonne déjà de ne pas retrouver à son époque certaines espèces décrites par ses ancêtres, alors que d'autres abondent malgré les prélèvements effectués par l'homme un siècle et demi avant les premières politiques de régulation de la chasse à la baleine: "Il y a en outre beaucoup d'espèces décrites dans le rituel étrusque, mais personne ne les a vues; il est surprenant qu'elles n'existent plus, quand on voit abonder encore celles que décime la gourmandise de l'homme."³.

Lacépède (1804) évoque la situation des baleines persécutées par l'homme : "L'homme, attiré par les trésors que pouvoit lui livrer la victoire sur les cétacées, a troublé la paix de leurs immenses solitudes, a violé leur retraite, a immolé tous ceux que les déserts glacés et inabordables des pôles n'ont pas dérobés à ses coups ; et il leur a fait une guerre d'autant plus cruelle qu'il a vu que des grandes pêches dépendoient la prospérité de son commerce, l'activité de son industrie, le nombre de ses matelots, la hardiesse de ses navigateurs, l'expérience de ses pilotes, la force de sa marine, la grandeur de sa puissance.

C'est ainsi que les géants des géants sont tombés sous ses armes ; et comme son génie est immortel, et que sa science est maintenant impérissable, parce qu'il a pu multiplier sans limites les exemplaires de sa pensée, ils ne cesseront d'être les victimes de son intérêt, que lorsque ces énormes espèces auront cessé d'exister. C'est en vain qu'elles fuient devant lui : son art le transporte aux extrémités de la terre ; elles n'ont plus d'asyle que dans le néant."⁴

Au cours des XIX^e et XX^e siècles, de nombreux auteurs ont pris conscience, et se sont inquiétés, de l'impact de l'homme sur la biodiversité. Lyell (1832) écrit "the annihilation of a multitude of species has already been effected and will continue to go on hereafter, in certain regions, in a still more rapid ratio, as the colonies of highly civilized nations spread themselves over unoccupied lands" et en 1860, l'anatomiste anglais Richard Owen considère que l'extinction des espèces fossiles résulte du " spectral appearance of mankind on a limited track of land not before inhabited " (in Grayson 1984). *Silent spring* évoque dès les années 1960 l'influence que les activités humaines, et les pesticides en particulier, peuvent avoir sur la nature (Carson 1962). Dans *The tragedy of the Commons* (Hardin 1968) explique les conséquences qu'a la croissance de la population humaine sur son bien-être, et la nécessité impérieuse de la limiter. Bertram (1969) écrit : "Even the minority, the preservationists and conservationists (...) have yet failed to see in full the awful vividness of the red light before them" ; "without sufficient [human] fertility control, we lose inevitably and for ever most of the remaining larger mammals of the world, very many of the birds, the

³ Historia Naturalis, X, XVII (XV)

⁴ Extrait du tome I de l'*Histoire Naturelle des Cétacés*, publié en 1804.

larger reptiles and some any more both great and small". Norman Myers a été l'un des premiers à parler d'extinction de masse dans son essai *The Sinking Arch* (Myers 1979). Dans les années 1980, ces préoccupations ont amené à l'émergence d'une nouvelle discipline : la Biologie de la Conservation (Soulé & Wilcox 1980 ; Soulé 1985 ; Gilpin & Soulé 1986 ; Belovsky 1987).

L'expression *diversité biologique* a été introduite par Thomas Lovejoy en 1980⁵ tandis que le terme *biodiversité* a été inventé par Walter G. Rosen en 1985 lors de la préparation du *National Forum on Biological Diversity* organisé par le *National Research Council* en 1986. Le mot " biodiversité " est publié pour la première fois en 1988 en titre du compte rendu de ce forum rédigé par E. O. Wilson. Dans son ouvrage *The Diversity of Life* (Wilson, 1992), il expose la nécessité de promouvoir un développement viable, car seule la lutte contre la pauvreté est à même de freiner la surexploitation de la biodiversité par " les paysans pauvres du tiers-monde ".

I.2.1.2 ... aux actes

La prise de conscience institutionnelle et la mise en œuvre des politiques de conservation suivront les cris d'alarme poussés par ces biologistes isolés. Mais c'est la naissance de groupuscules de pression (lobbies) qui catalysera la mise en œuvre de ces politiques.

Les sociétés savantes et les regroupements de naturalistes visant à la protection de la nature naissent en Amérique. Henry David Thoreau (1817-1862) et George Marsh (1801-1882) sont parmi les premiers auteurs à analyser les impacts destructeurs de l'humanité sur la nature (juste avant la naissance du terme "écologie" en 1866, créé par le zoologiste allemand Haeckel). Ils sont suivis par des écrivains-naturalistes, tels John Muir et John Burroughs, dont les récits de voyages dans l'immensité sauvage de l'Amérique vont amorcer le mouvement de conservation de la nature aux États-Unis et l'ancrer fortement dans l'imaginaire américain. Muir sera à l'origine de la création du Parc national de Yosemite en 1890, mais aussi d'une importante association d'amateurs de nature, le *Sierra Club*, créé en 1892, qui suit la création en 1886 de l'*Audubon Society for the Protection of Wild Birds and Their Eggs* (enregistrée en 1905 sous le nom de " *National Association of Audubon Societies for the Protection of Wild Birds and Animals* "). La *New York Zoological Society*, fondée en 1895 pour créer le zoo du Bronx, met en place dès 1900 un programme de protection des bisons des plaines. Cette société devient l'actuelle et très influente *Wildlife Conservation Society* (WCS) en 1993.

En Europe, la *Common Preservation Society* est fondée en Grande Bretagne en 1865 ; la *Royal Societies for the Protection of Birds* est créée en 1889 à la suite d'une loi de 1864 sur la protection des oiseaux marins et en réponse au commerce des plumes exotiques. En France, la *Société d'Acclimatation de France* (fondée en 1856) se préoccupe dès 1901 de "la protection de la nature et de ses ressources". Elle devient en 1960 la *Société Nationale de Protection de la Nature* (SNPN).

D'autres structures se forment à l'échelle internationale : en 1948 l'*Union Internationale de Protection de la Nature* voit le jour, rebaptisée en 1956 *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) à l'issue d'un long processus entamé par une conférence internationale à Berne en 1913, et pour lequel associations (la première étant la *Ligue Suisse pour la Protection de la Nature*, fondée en 1909), institutions (parmi lesquelles le *Muséum national d'Histoire naturelle* à Paris), gouvernements et l'Unesco (en la personne de son directeur, le biologiste Julian Huxley) ont associé leurs efforts (Blandin 2009). Son objectif est de fédérer au niveau international les politiques de conservation dans une structure para-onusienne (Rodary & Castellanet 2003). Sous l'impulsion de l'IUCN, le *World Wildlife Fund* (WWF) est créé en 1961, d'abord comme instrument de récolte de fonds auprès du grand public, puis comme organisme indépendant dès 1986. La même année voit la naissance de l'*African Wildlife Foundation*.

Ces organismes vont jouer un rôle important dans la création d'accords environnementaux transfrontaliers. Ainsi, selon Leroy (2004), la FAO comptabilise plus de 140 accords multilatéraux sur l'environnement (excluant les accords bilatéraux et les directives européennes), antérieurs à 1992, tandis que Humber (1995), répertorie une vingtaine de conventions et traités relatifs au seul thème de la protection de la nature. La plupart seront réunis dans la Convention sur la Diversité Biologique (CDB), en 1992 (Robillard 2010).

⁵ "Hundreds of thousands of species will perish, and this reduction of 10 to 20 percent of the earth's biota will occur in about half a human life span....This reduction of the biological diversity of the planet is the most basic issue of our time." Préambule de *Conservation Biology*, Michael Soulé and Bruce Wilcox, 1980.

En 1972, la conférence des nations unies sur l'environnement adopte une série de principes (appelée " Déclaration de Stockholm "), qui initie un dialogue international sur la croissance économique, la pollution de l'indivis mondial (air, eau, océans) et le bien-être des peuples dans le monde entier. En 1992, la conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement (connue sous le nom de " Sommet Planète Terre ") adopte une déclaration qui fait progresser le concept des droits et des responsabilités des pays dans le domaine de l'environnement. Au cours de ce sommet trois conventions ont été approuvées, la Convention sur la Diversité Biologique (CDB), la Convention-cadre sur les changements climatiques et la Convention sur la lutte contre la désertification, ainsi que l'Agenda 21 et une déclaration sur la gestion, la conservation et le développement durable des forêts.

La CDB est adoptée en France en 2004, avec notamment la Stratégie Nationale pour la Biodiversité, une des déclinaisons principales de la Stratégie Nationale de Développement Durable.

I.2.1.3 La protection de la biodiversité pour elle-même

Les premières initiatives de protection des espèces suivent des intérêts d'ordre économique, comme la préservation des ressources halieutiques et du gibier. Le problème du nom des taxons ne se pose pas, il s'agit d'éviter la disparition ou la raréfaction d'un stock d'espèces " consommées sur place ".

Dans la même logique de préservation de cette ressource va s'engager une chasse parfois acharnée et sans discernement de certains prédateurs du gibier ou du poisson, principalement les carnivores, mais aussi les rapaces, que l'on appelle les nuisibles : une loi du 3 août 1882 vise à la destruction des Loups, en 1940, il ne reste plus de loups en France. Quelques 4 000 Loutres d'Europe étaient piégées chaque année entre 1890 et 1930.

Au milieu du XX^e siècle, l'impact des activités humaines autres que la chasse, avec notamment le fameux DDT, commence également à se faire sentir sur la faune. Certaines espèces victimes à la fois de la surchasse et des activités humaines, comme le Faucon pèlerin *Falco peregrinus* Tunstall, 1771, atteignent des seuils critiques et deviennent des symboles pour les protecteurs de la nature. Sous la pression des lobbies naturalistes (principalement des ornithologues), des mesures de protection d'espèces non consommées vont être mises en place dans les années 1970. En France, une première liste des espèces protégées voit le jour avec la Loi n° 76-629 du 10 juillet 1976 relative à la protection de la nature. Il s'agit essentiellement d'une liste d'espèces " non-chassables ", visant à empêcher la disparition d'espèces menacées par des prélèvements directs. Aujourd'hui, cette loi a évolué et intègre des espèces menacées par les aménagements : plantes et invertébrés ont peu à peu intégré la liste d'espèces visées par l'article 1.

Au niveau international, la CITES (Convention on International Trade of Endangered Species) est signée en 1973 et liste aujourd'hui 34 000 espèces animales et végétales, réparties en trois annexes. La convention de Berne, qui vise à la protection des espèces migratrices, est signée en 1979. La même année, la Directive européenne 2009/147/CE relative à la conservation des oiseaux sauvages (Directive " Oiseaux ") engage les états membres à mettre en place des mesures réglementaires pour protéger une liste d'espèce à l'échelle européenne. De la même manière, ces différentes conventions visent initialement à protéger des espèces victimes de prélèvements directs. Il faut attendre 1992, avec la Directive " Habitats", pour que des mesures visant explicitement la préservation de la biodiversité menacée indirectement par les activités humaines soient adoptées.

Aujourd'hui, les principaux leviers de la préservation de la biodiversité en France sont les directives européennes et la liste des espèces protégées par la loi. Les Directives européennes, bien qu'étant basées sur des listes d'espèces, protègent des territoires (Zones de Protection Spéciales et Zones Spéciales de Conservation) avec l'idée de concilier activités humaines et économiques et protection de la biodiversité ; la liste des espèces protégées n'est pas spatialisée et vise directement une liste de taxons. Trois espèces de naïades sont directement visées par la Directive Habitats : *Margaritifera margaritifera* et *Unio crassus* figurent aux annexes II et IV ; *Margaritifera auricularia* à l'annexe IV. Aucune espèce de mollusques stygobie n'est listée dans la Directive Habitats, en revanche l'habitat 8310-4 " Rivières souterraines, zones noyées, nappes phréatiques " est considéré comme un habitat d'intérêt communautaire. Trois espèces de naïades et dix-huit espèces de mollusques stygobies sont protégées en France au titre de la loi relative à la protection de la nature (Tableau 1).

La plupart des acteurs de la conservation s'accordent aujourd'hui sur le fait que la menace principale pesant sur la nature est la modification des paysages. La chasse n'est pas exclue des sites Natura 2000 et la liste des espèces protégées dépasse aujourd'hui largement les espèces chassables. En revanche, ces dispositions contraignent essentiellement les aménageurs. Les études d'impact environnemental et les

études d'incidence sont rendues obligatoire en préalable à tous " projets de travaux, d'ouvrages ou d'aménagements publics et privés qui, par leur nature, leurs dimensions ou leur localisation sont susceptibles d'avoir des incidences notables sur l'environnement ou la santé humaine " (Article L122-1 du Code de l'Environnement).

I.2.1.4 Les fonctionnalités : un agenda optimiste pour le XXI^e siècle ?

Au-delà de la conservation des espèces et des espaces, une troisième dimension voit le jour avec la notion de fonctionnalité. Elle naît de l'idée que les écosystèmes tels qu'on les connaît aujourd'hui sont déjà trop perturbés pour permettre leur préservation à long terme. Les équilibres naturels se sont mis en place au cours de périodes dépassant largement la période historique, pour laquelle les impacts humains sont documentés. Or l'extinction de la mégafaune a pris place essentiellement à partir du Pléistocène, soit récemment à l'échelle de l'évolution des écosystèmes. Cette mégafaune devait jouer un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes, principalement dans le transfert de matière organique (ex. Roman & McCarthy 2010 ; Daufresne 2013), mais aussi dans les équilibres proies – prédateurs (ex. Estes *et al.* 1998). Les écosystèmes seraient donc inéluctablement condamnés, à moins de restaurer leurs fonctionnalités, soit en réintroduisant en priorité les espèces clef de voute, soit, quand il s'agit d'espèces éteintes, en leur suppléant des *proxies*. C'est ce que propose le courant de pensée *Pleistocene rewilding* (Foreman 2004 ; Donlan *et al.* 2006).

Les géants disparaissent en premier : l'Esturgeon d'Europe *Acipenser sturio* Linnaeus 1758, le plus gros poisson que nos rivières aient connu, a quasiment disparu, tout au moins de nos cours d'eau (la dernière reproduction naturelle documentée date de 1994). Une espèce de cette taille avait forcément un rôle fonctionnel dans l'écosystème, par exemple dans les transports de matière organique, en apportant chaque année des dizaines de milliers d'œufs, sans rien prélever puisqu'il ne se nourrit pas pendant cette période. Mais outre l'apport en matière organique, c'était vraisemblablement l'hôte intermédiaire privilégié d'un deuxième géant des rivières, lui aussi en voie d'extinction, la Grande Mulette *M. auricularia*. Pour restaurer cette fonctionnalité perdue, et sauver la Grande Mulette d'un schéma d'extinction en cascade, nous avons proposé de réfléchir à la ré-introduction d'un proxy, l'esturgeon de l'Atlantique *A. oxyrinchus* Mitchill, 1815 (Prié & Cochet 2010).

Tableau I : liste des espèces de mollusques protégées sur le territoire français. Les naïades et les espèces stygobies sont encadrées

<i>Anisus vorticulus</i> .	Article 2
<i>Elona quimperiana</i> (Férussac, 1821), escargot de Quimper.	Article 2
<i>Pseudunio auricularis</i> (Spengler, 1793) (synonyme : <i>Margaritifera auricularia</i>).	Article 2
<i>Margaritifera margaritifera</i> (Linné, 1758), moule d'eau douce ou mulette perlière.	Article 2
<i>Unio crassus</i> (Philipsson, 1788).	Article 2
<i>Helix ceratina</i> (synonyme : <i>Helix tristis</i>) (Hélix de Corse) (Pfeiffer, 1843).	Article 3
<i>Cyrantheba corsica</i> (Shuttleworth, 1843).	Article 3
<i>Tacheocampylaea raspaili</i> (Escargot de Raspail) (Payraudeau, 1826).	Article 3
<i>Macularia niciensis</i> (Escargot de Nice) (Férussac, 1821).	Article 3
<i>Macularia saintyvesi</i> (Caziot in Kobelt, 1906).	Article 3
<i>Otala punctata</i> (synonyme : <i>Otala apalolena</i>) (<i>Otala</i> de Catalogne) (Muller, 1774).	Article 3
<i>Norelona pyrenaica</i> (Draparnaud, 1805).	Article 3
<i>Laminifera pauli</i> (Mabille, 1865).	Article 3
<i>Arganiella exilis</i> (Paladilhe, 1867) (synonyme : <i>Horatia exilis</i>).	Article 4
<i>Avenionia brevis</i> (Draparnaud, 1805).	Article 4
<i>Belgrandiella pyrenaica</i> (Boeters, 1983).	Article 4
<i>Bythinella bicarinata</i> (des Moulins, 1827).	Article 4
<i>Bythinella carinulata</i> (Drouet, 1868).	Article 4
<i>Bythinella pupoides</i> (Paladilhe, 1869).	Article 4
<i>Bythinella reyniesii</i> (Dupuy, 1851).	Article 4
<i>Bythinella vesontiana</i> (Bernasconi, 1989).	Article 4
<i>Bythinella viridis</i> (Poiret, 1801).	Article 4
<i>Bythiospeum articense</i> (Bernasconi, 1985).	Article 4
<i>Bythiospeum bressanum</i> (Bernasconi, 1985).	Article 4
<i>Bythiospeum diaphanum</i> (Michaud, 1831).	Article 4
<i>Bythiospeum garnieri</i> (Sayn, 1889).	Article 4
<i>Fissuria boui</i> (Boeters, 1982).	Article 4
<i>Hauffenia minuta</i> (Draparnaud, 1805).	Article 4
<i>Hydrobia scamandri</i> (Boeters, Monod et Vala, 1977).	Article 4
<i>Litthabittella elliptica</i> (Paladilhe, 1874).	Article 4
<i>Moitessieria lineolata</i> (Coutagne, 1882).	Article 4
<i>Moitessieria locardi</i> (Coutagne, 1883).	Article 4
<i>Moitessieria puteana</i> (Coutagne, 1883).	Article 4
<i>Moitessieria rayi</i> (Locard, 1883) (synonyme : <i>Lartetia rayi</i>).	Article 4
<i>Moitessieria rolandiana</i> (Bourguignat, 1863).	Article 4
<i>Moitessieria simoniana</i> (Saint-Simon, 1848).	Article 4
<i>Paladilhia pleurotoma</i> (Bourguignat, 1865).	Article 4
<i>Paladilhioipsis bourguignati</i> (Paladilhe, 1866).	Article 4
<i>Palacanthilhiopsis vervierii</i> (Bernasconi, 1988).	Article 4
<i>Plagigeyeria conilis</i> (Boeters, 1974).	Article 4
<i>Platyla foliniana</i> (Nevill, 1879).	Article 4
<i>Renea bourguignatiana</i> (Nevill, 1880).	Article 4
<i>Renea gormonti</i> (Boeters, Gittenberger et Subai, 1989).	Article 4
<i>Renea moutonii</i> (Dupuy, 1849).	Article 4
<i>Renea paillona</i> (Boeters, Gittenberger et Subai, 1989).	Article 4
<i>Renea singularis</i> (Pollonera, 1905).	Article 4
<i>Abida secale ateni</i> (Draparnaud, 1801).	Article 4
<i>Chondrina megacheilos</i> (Cristofori et Jan, 1832).	Article 4
<i>Solatopupa cianensis</i> (Caziot, 1910).	Article 4
<i>Solatopupa guidoni</i> (Caziot, 1903).	Article 4
<i>Solatopupa psarolena</i> (Bourguignat, 1859).	Article 4
<i>Truncatellina arcyensis</i> (Klemm, 1943).	Article 4
<i>Cryptazeca monodonta</i> (Folin et Bérillon, 1877).	Article 4
<i>Cryptazeca subcylindrica</i> (Folin et Bérillon, 1877).	Article 4
<i>Hypnophila remyi</i> (Boettger, 1949).	Article 4
<i>Trissexodon constrictus</i> (Boubée, 1836).	Article 4
<i>Vitrea pseudotrolli</i> (Pinter, 1983).	Article 4
<i>Macrogasta lineolata euzieriana</i> (Bourguignat, 1869).	Article 4

I.2.2 Mécanismes, paradoxes et biais de la conservation

I.2.2.1 Les espèces charismatiques

Les acteurs de la conservation donnent généralement trois bonnes raisons de préserver la biodiversité : la pharmacopée, soit le gisement de molécules pouvant *in fine* être utilisées par l'homme ; la résilience des écosystèmes, puisqu'on constate que plus un écosystème est diversifié, mieux il résiste aux agressions environnementales (catastrophes naturelles, ravageurs, parasites etc.) ; et les aspects culturels (voir Wilson, 1992 pour une revue de toutes les raisons de protéger la biodiversité). On retrouve donc dans les racines de la protection de la nature les intérêts économiques, un raisonnement scientifique, et des aspirations socioculturelles (préserver les espèces charismatiques ou les paysages).

Paradoxalement, les intérêts économiques ne sont pas le moteur le plus puissant de protection des espèces. En témoignent la gestion inappropriée des stocks de poissons marins, qu'il s'agisse de Thon rouge *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758) en méditerranée, de Morue *Gadus morhua* Linnaeus, 1758 en Atlantique Nord, d'Anchois (famille des Engraulidae, Gill, 1861) dans le Golf de Gascogne et même d'Anguilles *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758) dans les rivières européennes. Ces mécanismes sont intrinsèquement conflictuels puisqu'ils doivent concilier avec la dichotomie entre la préservation et les prélèvements ; qu'ils sont liés à des enjeux socio-économiques, voire culturels ; et qu'ils sont transnationaux.

L'émotion du public face à la raréfaction des baleines ou des bisons, ou plus récemment à celle des éléphants, des tigres ou des pandas, reste le moteur le plus puissant de la mise en place de politiques de conservation. En conséquence, l'essentiel des moyens dédiés à la conservation est fléché vers les grandes espèces, les vertébrés, qui ne représentent pourtant qu'une faible part de la biodiversité (Fig. 6).

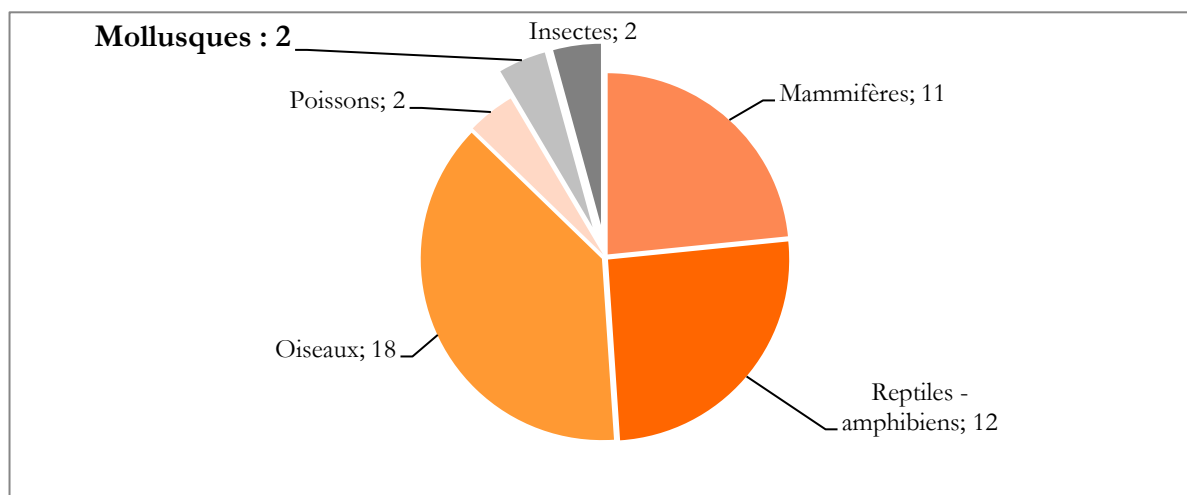


Figure 6 : répartition des Plans Nationaux d'Actions (PNA) pour la Faune en France par grands groupes taxonomiques. Les invertébrés sont sous-représentés : chaque PNA correspond à une espèce, sauf ceux des insectes qui concernent plusieurs espèces (" Odonates " et genre *Maculinea*). Les deux PNA mollusques étaient initialement regroupés en un seul pour *Margaritifera margaritifera* et *M. auricularia*. (source : <http://www.developpement-durable.gouv.fr/-Les-plans-faune,4888-.html>, consulté en mai 2013).

Les motivations visant la protection des grandes espèces se basent uniquement sur la sensibilité du grand public ; elles sont *a priori* complètement déconnectées des considérations scientifiques et peuvent même entrer directement en conflit avec les exigences économiques (ex. l'Ours brun dans les Pyrénées).

La préservation de la biodiversité telle qu'initiée par les scientifiques se veut plus objective, mais reste ineffablement tributaire de facteurs culturels ou émotionnels : les lobbies de protection des oiseaux demeurent plus puissants que ceux des invertébrés et drainent l'essentiel des fonds dédiés à la conservation de la nature, au détriment des " autres 99% " (Ponder & Lunney 1999 ; Régnier *et al.* 2009).

Les efforts de conservation ciblés sur les organismes de grande taille, les vertébrés ou les espèces charismatiques, sont généralement justifiés par l'idée d'espèce stratégique. Les espèces stratégiques peuvent être les espèces clef de voute (*keystone species*), qui ont un rôle primordial pour l'écosystème et dont

L'extinction produit un déséquilibre et des co-extinctions ; les espèces indicatrices (*indicator species*), dont l'état de conservation est censé rendre compte de l'état de conservation de tout l'écosystème et donc des espèces associées⁶ ; les espèces parapluie (*umbrella species*) qui sont tributaires de multiples écosystèmes ou de grands territoires. S'ajoutent les espèces étendard (*flagship species*) qui attirent l'attention du grand public et facilitent la mise en œuvre des mesures de protection. Il existe toutefois un large corpus de connaissances qui critique ces approches car la protection des quelques espèces visées n'implique pas celle des très nombreuses espèces non visées (ex. Kerr 1997 ; Caro 2003 ; Fontaine *et al.* 2007).

Les efforts de conservation initiés par les biologistes restent inévitablement orientés vers les valeurs culturelles ou émotionnelles, subjectives, au détriment des espèces objectivement menacées et parfois plus légitimes en tant qu'espèces parapluie ou espèces clef de voûte. Par exemple, la biomasse des termites en Afrique est supérieure à celle des éléphants (Pringle *et al.* 2010), et leur rôle fonctionnel, comme celui des bactéries, des champignons ou des vers de terre, justifierait qu'elles soient considérées comme clef de voûte.

Ce déséquilibre entre les espèces charismatiques bénéficiant de l'essentiel des fonds liés à la conservation de la nature et les besoins de protection d'espèces moins charismatiques et souvent décrié par les malacologues. Toutefois, le même phénomène frappe la communauté malacologique : sur les 64 millions d'Euros dédiés à la protection des bivalves par l'Europe, *Margaritifera margaritifera* s'octroie la part du lion avec plus de 50 millions d'Euros de financements. *Unio crassus* est également très charismatique et a pu bénéficier de 22 millions d'Euros. Les autres espèces ne sont quasiment pas considérées par les politiques de conservation malgré des aires de répartition plus limitées et un déclin estimé plus important, donc des enjeux de conservation plus importants également (**Tableau 2**). Cette situation paradoxale peut s'expliquer par des raisons sociologiques : ayant des aires de répartition plus vastes, *Margaritifera auricularia* et *Unio crassus* concernent un public plus important. Le lobbying en faveur de ces espèces est donc plus puissant et permet de drainer l'essentiel des fonds proposées par l'Europe (Prié 2013).

Pour une meilleure prise en compte des espèces menacées à aire de répartition restreinte il est donc nécessaire de les faire connaître, de sensibiliser autant le grand public que les gestionnaires, de manière à faire valoir leurs droits (ENCART 2).

Pour ce qui concerne les stygobies, qui sont des espèces de petite taille, difficiles à observer et non-charismatiques par excellence, on observe un déséquilibre encore plus frappant entre les statuts IUCN établis en 2011 et les espèces retenues par la loi de protection de la nature (**Tableau 3**). Le déséquilibre est du cette fois à l'avancée des connaissances à l'époque de l'établissement de la liste des espèces protégées. Les espèces les mieux connues à l'époque étaient des espèces à large répartition. Les espèces décrites depuis sont généralement micro-endémiques (donc plus vulnérables) et, n'étant pas connues à l'époque, n'ont naturellement pas été intégrées à la liste des espèces nécessitant une protection (Bouchet 1990).

Les mécanismes de la conservation de la nature exposés ci-dessus mettent en évidence le poids du phénomène social : des personnalités isolées alertent sur la conservation de paysages, d'écosystèmes ou d'espèces, puis se forment des groupes de pression qui influencent les politiques. Dès les origines, la force de ces groupes de pression tient essentiellement dans leur nombre et leur organisation. L'un des mécanismes les plus importants pour la popularisation d'une action de conservation est sa capacité à regrouper un nombre important de personnes autour d'un intérêt commun.

Paradoxalement, ce but est plus facile à atteindre pour des espèces charismatiques à large répartition que pour des endémiques restreints, plus vulnérables, mais qui ne concernent que quelques spécialistes...

⁶ L'idée de protéger une espèce indicatrice parce qu'elle indique l'état de santé de tout l'écosystème pose un gros problème méthodologique : si des mesures de protections ciblées sur une espèce indicatrice permettent de la maintenir en vie, elle n'est plus indicatrice que d'elle-même, pas de l'état de santé de son écosystème. Une espèce indicatrice devrait au contraire être ignorée des politiques de conservation, mais ciblées par les protocoles de surveillance.

Tableau 2 : Part des financements européens attribués aux espèces de naïades d'Europe en comparaison des enjeux de conservation. EOO : " Extent of Occurrence " sensus IUCN ; le déclin estimé à partir de la modélisation d'habitat sur les espèces françaises uniquement (Prié et al. 2013) ; catégories IUCN : CR : en danger critique d'extinction, EN : En Danger d'extinction, VU : vulnérable, NT : quasi-menacé, LC : non menacé, NE : non-évalué.

Espèces européennes	Part des financements européens (%)	EOO (km ²)	Déclin (%)	Catégorisation IUCN
M. margaritifera	69,3	7 000 000	53	EN
U. crassus	27,9	10 000 000	42	EN
M. auricularia	2,4	160 000	89	CR
U. tumidiformis	0,4	100 000	-	VU
U. gibbus	0	100 000	-	NE
M. bonelli	0	100 000	-	NE
U. delphinus	0	200 000	-	NT
U. ravoisieri	0	300 000	-	NE
U. mancus	0	900 000	31	LC
P. littoralis	0	1 300 000	73	NE
P. complanata	0	5 000 000	-	VU
U. tumidus	0	5 500 000	71	LC
U. pictorum	0	6 500 000	18	LC
A. cygnaea	0	9 000 000	-	LC
A. anatina	0	10 500 000	-	LC

Tableau 3 : Statut IUCN des espèces de mollusques stygobies de la faune de France et statut de protection. Les espèces non évaluées (DD, data deficient) ne sont pas intégrées. CR : en danger critique d'extinction ; EN : en danger d'extinction ; VU : vulnérable ; LC non menacé.

Espèce	Statut IUCN	Protection en France
<i>Bythinella eutrepha</i>	CR	
<i>Henrigiardia wienini</i>	CR	
<i>Bythiospeum klemmi</i>	EN	
<i>Alzoniella perrisii</i>	EN	
<i>Alzoniella elliptica</i>	EN	
<i>Plagigeyeria deformata</i>	EN	
<i>Moitessieria heideae</i>	EN	
<i>Paladilhia umbilicata</i>	EN	
<i>Paladilhia gloeri</i>	EN	
<i>Heraultiella exilis</i>	VU	X
<i>Bythinella padiraci</i>	VU	
<i>Bythinella galerae</i>	VU	
<i>Palacanthilhiopsis vervierii</i>	VU	X
<i>Palaospeum bessoni</i>	VU	
<i>Palaospeum nanum</i>	VU	
<i>Moitessieria massoti</i>	VU	
<i>Moitessieria nezi</i>	VU	
<i>Moitessieria calloti</i>	VU	
<i>Moitessieria juvenisanguis</i>	VU	
<i>Paladilhia jamblossensis</i>	VU	
<i>Paladilhia roselloi</i>	VU	
<i>Avenionia brevis</i>	LC	X
<i>Avenionia berenguieri</i>	LC	
<i>Fissuria boui</i>	LC	X
<i>Bythiospeum diaphanum</i>	LC	X
<i>Bythiospeum garnieri</i>	LC	X
<i>Bythiospeum bourguignati</i>	LC	X
<i>Bythiospeum bressanum</i>	LC	X
<i>Bythiospeum diaphanoïdes</i>	LC	
<i>Bythiospeum charpyi</i>	LC	
<i>Bythiospeum articense</i>	LC	X
<i>Islamia moquiniana</i>	LC	
<i>Islamia minuta</i>	LC	X
<i>Moitessieria simoniana</i>	LC	X
<i>Moitessieria locardi</i>	LC	X
<i>Moitessieria lescherae</i>	LC	
<i>Moitessieria rolandiana</i>	LC	X
<i>Paladilhia conica</i>	LC	
<i>Paladilhia pleurotoma</i>	LC	X
<i>Spiralix vitrea</i>	LC	
<i>Spiralix rayi</i>	LC	X

ENCART 3 : Les espèces charismatiques comme causes de l'érosion de la biodiversité. Cas de l'étang de Scamandre

L'étang de Scamandre dans le sud de la France figure parmi les sites emblématiques de la Camargue, vaste delta du Rhône qui abrite des écosystèmes diversifiés et singuliers, popularisés par les flamants-roses, les taureaux et quelques chevaux blancs folkloriques. Mais au-delà du folklore, la Camargue est effectivement une des zones humides les plus remarquables de France, par son étendue, son fonctionnement et son histoire.

En 1977, Boeters *et al.* décrivent une nouvelle espèce d'Hydrobie, endémique de l'étang du Scamandre et environs, nommée de manière explicite *Heleobia scamandri* (Boeters *et al.* 1977). Les espèces du genre *Heleobia* sont des Hydrobies de petite taille, qui vivent dans des milieux saumâtres, généralement à l'interface entre les eaux douces et marines au niveau des lagunes, des estuaires, et localement autour de sources d'eau douce en milieu marin (ex. Calanques de Marseille). Comme la plupart des hydrobioides, cette espèce a été simplement ignorée jusqu'à aujourd'hui, reportée de checklists en checklists sans avoir vraiment été ré-évaluée. Et ce malgré des enjeux de conservation potentiellement importants puisqu'elle figure, en tant qu'endémique restreinte, à l'article 1 de la liste des espèces protégées.

Un des atouts du travail en bureaux d'études est d'être confronté, de manière totalement opportune, à des problématiques de ce type : Voies Navigables de France (VNF) souhaite adoucir quelques courbes du canal du Rhône à Sète de manière à faire transiter des péniches de gros gabarit et sollicite Biotope pour ces travaux soumis à étude d'impact. Une des espèces mentionnées dans les listes qui empoisonnent la vie des aménageurs est un escargot microscopique : l'Hydrobie du Scamandre *Heleobia scamandri*.

Le statut taxonomique de cette espèce est douteux (Girardi 2009a ; Gofas 2010 ; Gargominy *et al.* 2011). J'ai donc proposé à VNF de tester sa mise en synonymie avec *H. stagnorum* (Gmelin, 1791) ou tout au moins, pour rester dans des termes juridiques appropriés, de génotyper les spécimens qui seraient récoltés sur l'emprise des travaux pour vérifier s'ils présentaient bien des particularités génétiques attribuables à *H. scamandri*, ou s'il s'agissait d'*H. stagnorum*, qui n'est pas protégé.

Malgré des recherches intensives (Fig. 8), nous n'avons pas pu récolter d'individus vivants. Nous avons consulté d'autres malacologues : Wilke (com. pers.) a recherché l'espèce en 2001 mais n'a pas pu retrouver d'individus vivants, ni sur la station-type, ni aux alentours. Girardi (com. pers.) a également recherché l'espèce sur la station type, d'où il la considère éteinte. Il n'a pas retrouvé d'individus vivants récemment, et le cadre de son travail publié en 2009 s'appuie uniquement sur des coquilles... Alors que Boeters *et al.* (1977) disaient l'avoir trouvée en abondance, l'Hydrobie du Scamandre semble avoir bel et bien disparu du Scamandre.



Figure 8 : prospections effectuées autour de l'étang de Scamandre (à droite) et de celui du Charnier (à gauche). Le point rose représente la localité type.

La station-type se situe juste à côté de la réserve naturelle régionale du Scamandre, un espace dédié à la protection de la biodiversité, alimenté par des fonds publics. J'ai consulté le plan de gestion du site ; il n'est fait aucune mention de cette espèce endémique restreinte. Les conservateurs avaient pourtant connaissance de l'existence de cette espèce (com. pers.). En revanche, les options de gestion mises en place visent favoriser les eaux douces, pour permettre la croissance de la roselière et des espèces associées : " A partir de 1995, des travaux de mise en place de petits ouvrages hydrauliques ont été réalisés en plusieurs endroits, avec comme objectifs la réhabilitation de marais à scirpes avec formation d'herbiers aquatiques, de zones de gagnage et de nidification pour l'Echasse blanche *Himantopus himantopus* (Linnaeus, 1758), et de roselières pour l'alimentation et la nidification du Héron pourpré *Ardea purpurea* Linnaeus, 1766. " Cette gestion de la roselière favorise également les sagneurs, les exploitants de roseaux, et participe de l'apaisement des conflits entre naturalistes et utilisateurs du milieu naturel.

Que l'Hydrobie du Scamandre soit une bonne espèce (disparue) ou un synonyme, cet exemple illustre surtout la perversion du rôle d'un espace dédié à la conservation de la nature. Cette réserve n'a tenu aucun compte de la préservation d'une espèce vulnérable, préférant s'investir la culture intensive d'espèces charismatiques à large répartition, comme l'Echasse blanche ou le Héron pourpré. Les activités humaines (tourisme, sagneurs, employés des associations de protection de l'environnement) sont préservées, mais la biodiversité décline dans la plus grande indifférence.

I.2.2.2 Geopolitical Species Concept : quand la conservation réinvestit la taxonomie

La conservation opérationnelle peut parfois ignorer les questions biologiques. En témoigne la disproportion entre les sommes allouées régionalement à des espèces à vaste répartition au détriment d'espèces endémiques restreintes (Prié 2013 ; ENCART 3). Pourtant, la notion d'espèce étant au centre de la conservation, les liens entre taxonomie et conservation devraient être évidents. Si May (1990) discute des effets négatifs d'une mauvaise taxonomie sur les enjeux de conservation, à l'inverse la tentation est grande pour le naturaliste de nommer les entités qui sont à ses yeux digne de conservation pour justifier d'efforts particuliers. Cette attitude échappe au réalisme dans l'attribution du nom et s'apparente plus au nominalisme : le nom ne s'applique plus à une entité supposée réelle, mais naît du besoin de désigner telle ou telle entité de conservation.

Ainsi, la population irlandaise de *M. margaritifera* de la rivière Nore en Irlande, dont l'écologie particulière et l'isolement laissent penser qu'il pourrait s'agir d'un taxon distinct (*M. cf. durrovensis*), a été étudiée par Chesney *et al.* (1993) puis par Machordom *et al.* (2003). Ces auteurs ne sont pas parvenus à mettre en évidence des caractères propres justifiant de considérer cette population comme un taxon valide. Néanmoins, en 1997 soit postérieurement aux travaux de Chesney *et al.* le taxon a été placé en tant qu'espèce (*M. durrovensis*) en annexe II de la directive Habitats (Council Directive 97/62/EC du 27 Octobre 1997).

La démarche scientifique réaliste implique de considérer *M. durrovensis* comme un synonyme de *M. margaritifera*. Une attitude pragmatique et nominaliste justifierait de conserver le nom pour mieux préserver cette population particulière. Lors de l'établissement de la liste de référence CLECOM (Check List of European Continental Mollusca), les spécialistes consultés ont choisi une voie intermédiaire en considérant cette population comme une sous-espèce, *M. m. durrovensis* (Bouchet 2006). Aujourd'hui, Bank *et al.* (2007) justifient le maintien de ce taxon dans la liste de référence en considérant que les différences écologiques et adaptatives de cette population impliquent une différenciation génétique.

Geist (com. pers.) reconnaît que toutes les populations de *M. margaritifera* étudiées par ses soins à l'échelle européenne ne présentent pas de différences génétiques suffisantes pour le maintien des sous-espèces actuellement valides, mais retarde la publication de ses résultats pour éviter d'affecter les mesures de conservations mises en œuvre pour les sous-espèces valides actuellement.

Dans ce cas, la hiérarchisation des enjeux, sur des choix subjectifs, influe de manière rétroactive sur la taxonomie. C'est une perversion des mécanismes de la conservation : au lieu de définir le statut de conservation des taxons puis de hiérarchiser les enjeux de conservations subséquents, des motivations guidées par un lobbying qui échappe à toute rationalité scientifique placent des espèces charismatiques en haut de la hiérarchisation, quitte à modifier la taxonomie a posteriori pour justifier leurs choix.

On retrouve ainsi beaucoup de taxons à la validité douteuse dans les listes d'espèces à enjeux : le Narcisse des Glénan *Narcissus triandrus* subsp. *capax* (Salisb. ex Sweet) D.A. Webb, 1978, est listé en annexes II et IV de la Directive Habitats, en annexe I de la Convention de Bern et protégé en France (article 1), alors que sa validité taxonomique n'est pas confirmée par les études qui ont pu être produites (Bioret *et al.* 1990). L'Ananas sauvage *Ananas nanus* (L.B. Smith) L.B. Smith, 1962 (syn. *A. ananassoides* var. *nanus*), est protégé en Guyane, malgré qu'il ne soit pas possible de le différencier génétiquement d'*A. comosus* (L.) Merr., 1917, l'espèce cultivée, issue de la souche sauvage *A. nanus* (Duval *et al.* 2001). L'orchidée *Dactylocriza occitanica* Geniez, Melki, Pain & Soca, 1995 est listée en annexe B de la CITES, protégée et déterminantes pour la désignation des ZNIEFF en Languedoc-Roussillon (édition 2009-2010), bien que Devos *et al.* (2006) n'aient pas pu la distinguer génétiquement de *D. majalis* (Rchb.) P. F. Hunt & Summerh., 1965. Karl & Bowen (1999) montrent bien à quel point il est difficile de synonymiser la Tortue noire *Chelonia agassizii* Bocourt 1868 en raison des enjeux de conservation dont elle bénéficie en ayant un nom. Ces auteurs proposent d'introduire un nouveau concept de l'espèce, le *geopolitical species concept*.

L'inflation taxonomique (Isaac *et al.* 2004) et son impact sur la conservation ont fait l'objet d'un débat fourni (Padial & Ibáñez 2005 ; Harris & Froufe 2005 ; Knapp *et al.* 2005 ; Pillon & Chase 2006 ; Morrison *et al.* 2009). Un consensus semble devoir se dégager de ces discussions, qui se résume en quelques citations : "The use of species lists in legislation and fundraising may (...) have created non-biological forces that favor splitting over lumping" (Morrison *et al.* 2009) ; "Recognition of numerous and poorly circumscribed orchid taxa is a serious obstacle to their conservation because rare, poorly defined species may be prioritized for conservation over taxonomically "good" species." (Pillon & Chase 2006) ; et pour conclure, "(...) taxonomy should remain in the hands of taxonomists, not of administrators, authors of checklists or databases or editors of journals." (Dubois 1998).

I.2.2.3 Objectiver et hiérarchiser les enjeux. Limites et perspectives des listes rouges

Pour contrecarrer ces biais liés aux passions humaines et rendre opérationnelle la conservation de la nature, le biologiste doit s'approprier une méthode objective. L'IUCN propose une telle méthode pour l'établissement des listes rouges et la hiérarchisation des enjeux de conservation (IUCN, 2001; IUCN, 2010). Cette méthode repose sur la vulnérabilité (aire de répartition restreinte ou population de faible taille), les menaces (réelles ou potentielles) et l'évolution des populations (ou de l'aire de répartition) de chaque espèce. Les listes rouges visent à la fois la sensibilisation du public et la hiérarchisation des enjeux de conservation.

D'une manière pragmatique et pour l'avoir expérimentée sur les gastéropodes aquatiques endémiques de France (Cuttelod *et al.* 2011), la méthode proposée par l'IUCN est difficilement applicable aux invertébrés. D'une part, parce que le manque de connaissances sur ce pan majoritaire de la biodiversité rend difficile voire impossible d'appliquer la plupart de critères : la taille des populations, et *a fortiori* son évolution, est difficile à mesurer. Quand elles peuvent être estimées, elles dépassent largement les seuils qui ont été définis historiquement pour les vertébrés (moins de 250 individus pour la catégorie " en danger critique d'extinction ", moins de 2 500 pour la catégorie " en danger ", moins de 10 000 individus pour la catégorie " vulnérable "). L'aire de répartition est également difficile à mesurer, par faute d'inventaire exhaustifs pour la plupart des espèces. D'autre part, et surtout, parce que la taxonomie des invertébrés est souvent sujette à des opinions contradictoires ; or tout le processus de catégorisation de la liste d'espèces à évaluer est directement tributaire de la taxonomie. Par exemple, si *Heleobia scamandri* est considéré comme une espèce endémique de l'étang du Scamandre, elle doit figurer parmi la liste des espèces vulnérables (et l'étang de Scamandre constitue alors une unité de conservation importante). En revanche, sa mise en synonymie avec *H. stagnorum* (Girardi 2009a), retire un taxon de la liste des espèces vulnérables (et retire à l'étang du Scamandre son importance dans la préservation de la biodiversité). Par principe de précaution, les acteurs de la conservation préfèrent généralement conserver les taxons douteux. L'alpha-diversité et les listes d'espèces menacées sont donc surestimées par ces taxons qui apparaissent endémiques de leur station type, qui n'ont jamais été revus depuis leur description, et qui cumulent donc tous les critères pour arriver au sommet de la hiérarchisation des enjeux. Concrètement, on risque de retrouver le biais critiqué par Pillon & Chase (2006), soit la priorité donnée à des taxons pour lesquels aucune action concrète de conservation n'est possible.

I.2.3 Place de la taxonomie dans la conservation

La conservation de la nature s'appuie aujourd'hui essentiellement sur l'unité taxonomique " espèce ". La taxonomie est donc au fondement de la conservation : les unités taxonomiques étant définies, leurs enjeux de conservation sont évalués en tenant compte de leur aire de répartition, de leur vulnérabilité, des menaces et de l'analyse de l'évolution des populations. Les moyens alloués à la conservation n'étant pas illimités, ces enjeux sont ensuite hiérarchisés en fonction de leur importance (Fig. 9). Dans les faits, ce processus est biaisé d'une part par l'opacité taxonomique, qui pose d'énormes problèmes par exemple dans l'application des critères IUCN aux mollusques souterrains, et d'autre part par des mécanismes sociaux, qui influent a posteriori sur la mise en œuvre des mesures concrètes de conservation, voir même, comme on l'a vu, sur la taxonomie elle-même. Les invertébrés sont les grands perdants de ces biais de hiérarchisation. Il est donc nécessaire aujourd'hui de disposer d'une taxonomie opérationnelle, permettant de redéfinir les unités de gestion et les enjeux de conservation.

Dans ce travail, je propose de redéfinir sur des bases moléculaires les unités taxonomiques de deux modèles, les naïades de France et les gastéropodes stygobies du nord-montpelliérain. La répartition de ces unités taxonomiques, définies ici comme des unités évolutives, est évaluée à la lumière de la biogéographie, dans l'objectif de proposer des échelles pour la délimitation des unités de gestion.

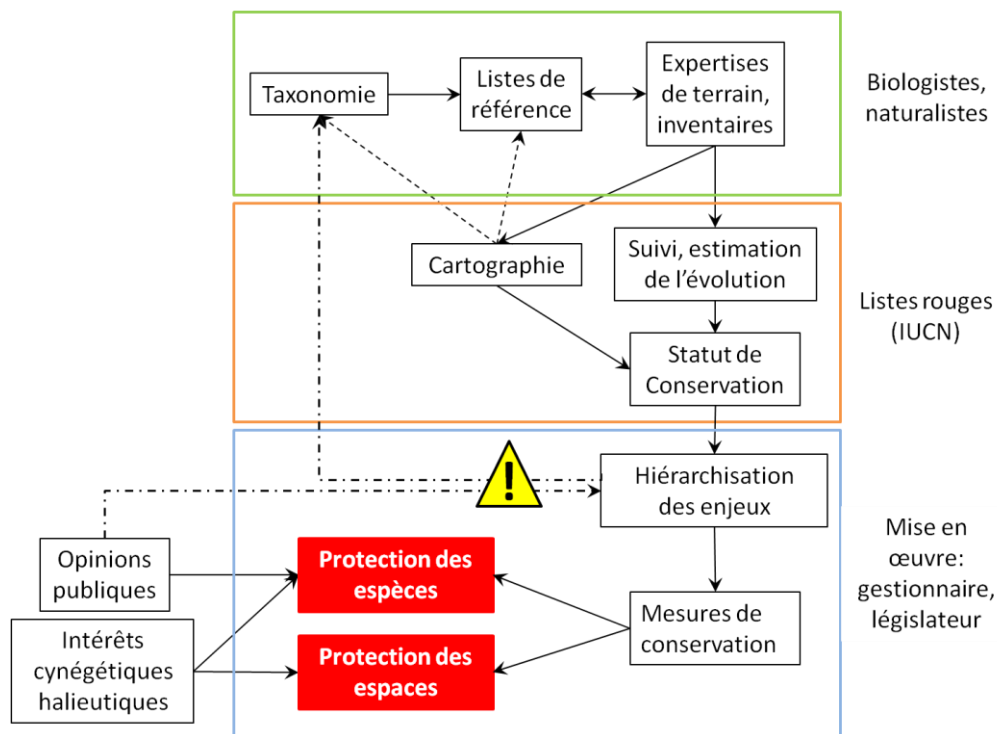


Figure 9 : fonctionnement théorique de la mise en place de mesures de conservation. Les listes de référence fournissent la base de l'évaluation de la biodiversité. Les enjeux de conservation sont hiérarchisés au regard de l'évolution de l'état de conservation des taxons (sous la forme de listes rouges par exemple). La cartographie peut influencer de manière rétroactive sur les listes de référence (présence ou non d'une espèce dans un périmètre donné), voir sur la taxonomie (isolats, mise en évidence de barrières géographiques favorisant l'apparition d'unités évolutives, vicariance). Deux facteurs peuvent biaiser considérablement ce schéma : les opinions publiques influencent directement la hiérarchisation des enjeux, et, dans certains cas, des unités taxonomiques sont maintenues uniquement pour des raisons de conservation.

I.3 PRESENTATION DES MODELES

I.3.1 Les naïades

Les naïades sont des animaux peu charismatiques, peu mobiles, souvent enfoncées dans le sédiment, mais qui peuvent nous raconter des histoires naturelles extraordinaires. Certaines ont une longévité exceptionnelle (jusqu'à près de 200 ans) et sont les témoins de deux siècles d'histoire des rivières ; leur coquilles et leurs perles ont fait couler beaucoup d'encre et on dispose de nombreux témoignages historiques à leur sujet (Valledor De Lozoya & Araujo 2011). Leur cycle reproductif, avec l'intervention d'un poisson-hôte, en font des animaux potentiellement très mobiles pendant les premiers stades de leur vie, mais ces déplacements sont en théorie limités aux limites des bassin-versants des fleuves.

I.3.1.1 Taxons

Le terme " naïades " désigne les grandes espèces de bivalves dulçaquicoles, soit en France les Mulettes (genres *Unio* Philipsson, 1788 ; *Potomida* Swainson, 1840 et *Margaritifera* Schumacher, 1815) et les Anodontes (genres *Anodonta* Lamarck, 1799 ; *Pseudanodonta* Bourguignat, 1877 et *Sinanodonta* Modell, 1945). *M. margaritifera* a été peu échantillonnée d'une part parce que c'est une espèce bénéficiant d'un statut de conservation et d'un lobbying important, d'autre part parce que de nombreuses études ont été réalisées sur cette espèce, qui fait sans doute partie des invertébrés les plus étudiés (ex. Geist *et al.* 2003 ; Geist 2005 ; Geist & Kuehn 2005 ; Geist 2010 et voir Prié 2013). Toutefois, quelques spécimens du massif central et des Pyrénées ont été séquencés pour tester la validité de la sous-espèce *M. m. brunnea*. Bien qu'elle ne pose pas de problème d'identification, en raison de sa taille, de son milieu de vie et de la forme particulière des coquilles adultes, *M. auricularia* a été étudiée moléculairement parce qu'il n'existait aucune donnée en France et que son état de conservation alarmant justifie que la question de possibles particularités génétiques soit posée. Aucune variabilité génétique n'ayant été observée entre les différentes populations françaises et espagnoles, il n'en sera plus question par la suite. Le groupe des Anodontes n'a pas été étudié parce que ses enjeux de conservation ont été jugés moins importants et que les moyens alloués à cette étude reposaient principalement sur les enjeux de conservation. Je me suis donc concentré sur les genres *Unio* et *Potomida*.

I.3.1.2 Histoire naturelle

Les bivalves sont des mollusques sans tête, pourvus d'un pied unique qui renferme la masse viscérale et de branchies appelées cténidies qui jouent un rôle à la fois dans la respiration, la collecte de nourriture et la reproduction (elles abritent les œufs et les jeunes larves). Les espèces d'eau douce forment un groupe polyphylétique au sein duquel Bogan (2008) compte 119 familles réparties en 206 genres et plus de 1 000 espèces. Les groupes les plus diversifiés sont les familles Sphaeriidae et Corbiculidae, et l'ordre des Unionida qui comptent autour de 800 espèces décrites dans le monde.

La plupart des espèces produisent des larves véligères planctoniques (ex. Dreissenidae et Corbiculidae), mais les Sphaeriidae sont vivipares, le développement se déroule dans une poche d'incubation. Les Unionida présentent la particularité d'avoir un stade parasitaire obligatoire, fixé sur les branchies ou sur le corps de poissons-hôtes.

Les stratégies sexuelles sont variables selon les espèces. Chez *A. anatina* Linnaeus, 1758 les sexes sont généralement séparés, avec quelques populations hermaphrodites, alors que chez *A. cygnaea* Linnaeus, 1758, les populations sont composées essentiellement d'individus hermaphrodites avec seulement quelques femelles. Chez *M. margaritifera*, et probablement chez *M. auricularia*, les sexes sont généralement séparés dans les populations denses, mais les animaux deviennent hermaphrodites quand la densité diminue (Bauer & Wächtler 2000 ; Araujo & Ramos 2001). Chez *U. crassus*, les sexes sont toujours séparés, avec un sex ratio équilibré (Engel 1990 ; Hochwald 1997, 2001).

I.3.1.3 La dispersion

Zoochorie ordinaire

Les naïades sont de grandes espèces, peu mobiles, avec un comportement globalement sédentaires. Leurs capacités de dispersion sont limitées et contraintes par la structure des réseaux hydrographiques : la mer et les eaux salées à l'aval des bassins-versants de fleuves ; les réseaux souterrains et les zones d'assèchement temporaire à l'amont. Elles sont soumises au courant et au transit sédimentaire, qui tend à les faire

naturellement dériver vers l'aval. Comme tous les organismes des cours d'eau, elles ont du développer une stratégie permettant de coloniser l'amont pour contrebalancer les effets du courant et de la dérive du substrat.

Les naïades de France présentent toutes le point commun d'utiliser un poisson-hôte pour la croissance, la métamorphose et la dispersion des stades juvéniles. Les spermatozoïdes émis par les individus mâles sont éjectés dans la colonne d'eau, puis collectés par les individus femelles situés en aval. La fécondation a lieu dans le marsupium, une cténidie modifiée, où débute la croissance des larves. Ces dernières, appelées glochidies, sont libérées par la femelle dans la colonne d'eau et disposent de quelques heures pour se fixer sur un poisson-hôte, où elles effectueront leur métamorphose.

Chez la plupart des espèces, la glochidie est pourvue de dents et peut se fixer sur diverses parties du corps du poisson. Chez certaines espèces (ex. Margaritiferidae et *Unio gibbus* Spengler, 1793), elle en est dépourvue et le bord de la glochidie est formé d'une matière élastique par laquelle elle adhère à l'épithélium des branchies du poisson-hôte. Le mouvement de fermeture de la glochidie est provoqué par le mucus de la peau du poisson ou artificiellement par du chlorure de sodium (Lefèvre & Curtis 1910). Des poils sensoriels qui se trouvent sur le corps faciliteraient la détection du poisson-hôte. Une fois la glochidie fixée, le muscle reste contracté. Au cours du développement de la jeune moule, il dégénère pour être remplacé par les deux muscles adducteurs. Contrairement à la plupart des Unionidae, chez *M. margaritifera*, la taille de la glochidie augmente dans le kyste formé sur les branchies et son taux de carbone organique est multiplié par 100. La glochidie absorberait les nutriments des cellules du poisson-hôte à l'aide d'un épithélium de cellules plissées qui recouvre sa surface inférieure.

L'ouverture de l'épithélium du kyste libère la jeune moule qui tombera sur le lit de la rivière et commencera sa croissance dans le sous-écoulement. Les jeunes stades sont très mobiles, le pied étant très allongé et capable de mouvements péristaltiques (Holder 2008). Les stades adultes sont au contraire relativement sédentaires chez la plupart des espèces, même si les adultes sont aussi capables de se déplacer activement ou de dériver avec le courant en cas de stress.

Le stade larvaire peut donc effectuer de grandes distances en bénéficiant des mouvements du poisson-hôte. Chez *M. margaritifera*, les glochidies adoptent deux types de comportements : certaines resteront seulement entre 20 et 60 jours fixées au poisson-hôte, alors que d'autres y séjourneront jusqu'à neuf mois, augmentant ainsi la probabilité de dispersion à grande distance.

La plupart des espèces de poisson-hôtes des naïades (**Tableau 4**) sont des poissons d'eau douce et il n'a pas été démontré que ce stade zoochorique pouvait permettre de franchir les mers et de passer d'un bassin versant à un autre. Toutefois, la survie des larves suite à un passage en mer a été observée et la très faible différenciation génétique entre les *M. margaritifera* européennes et nord-américaines, comme celle entre les *M. auricularia* des bassins-versants méditerranéens (Ebre) et Atlantiques (Loire, Charente, Garonne, Adour) laisse penser que des échanges pourraient être possibles. Mais pour l'essentiel des espèces, la dispersion par le poisson-hôte reste contrainte par la structure des hydrosystèmes. Seules la diffluence, soit la capture de cours d'eau des têtes de bassins par les bassins adjacents (Weisrock 1997) qui constitue le mode de dispersion le plus fréquent pour les poissons (Persat & Keith 2011) et la fluctuation du niveau des mers, qui a permis aux fleuves actuels de confluer, a pu permettre par le passé la colonisation épisodique de bassins-versants adjacents par les poissons-hôtes, et donc par les naïades.

Zoochorie exceptionnelle

Une autre forme de zoochorie, plus anecdotique, est signalée par Darwin (Darwin 1878 ; Darwin 1882) qui aurait observé des canards volant avec des bivalves de grande taille accrochés à leurs pattes. Adams (1905) témoigne de l'observation d'un Pluvier avec une Anodonte attachée au pied. On peut imaginer que les oiseaux d'eau peuvent occasionnellement passer un doigt entre les valves entrouvertes d'une naïade, laquelle se refermerait au contact sur la palme, provoquant vraisemblablement la fuite et l'envol du volatile, et la dispersion du stade adulte. La dispersion et le brassage génétique entre les grands bassins-versants pourraient résulter de processus de ce type. Chez les petites espèces, ce type d'occurrence semble plus régulier : des stades juvéniles de Moules zébrées *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) ont été observés sur des Canards souchets *Anas platyrhynchos* (Linnaeus, 1758) (Johnson & Carlton 1996) ; les Pisidies (*Pisidium* & *Sphaerium* spp.) peuvent s'attacher aux pattes des insectes ou des amphibiens (Kew 1893 ; Rees 1952 ; Lansbury 1955).

I.3.1.4 Des perles et des boutons

Des coquilles de naïades auraient été utilisées pour la première fois comme outils par *Homo erectus* (Joordens *et al.* soumit). Elles étaient utilisées comme parure au Chasséen (Cochet 2004). Aux époques historiques, ce sont surtout leurs perles qui ont attiré l'attention des hommes.

Pline l'ancien évoque dès le premier siècle l'usage des perles de naïades, et leur attribue l'origine du nom " *Unio* " ⁷. Il est difficile de mesurer l'impact qu'a pu avoir la pêche des naïades pour leurs perles, mais elle a probablement été l'une des premières causes de raréfaction des Margaritiferidae. D'après Hessling (1859) 158 000 perles ont été collectées en Bavière entre 1814 et 1857. Sachant qu'on trouve statistiquement une perle pour 1000 à 3000 individus, près de 500 millions d'individus auraient pu être sacrifiés en 40 ans. Selon Bonnemère (1901) huit à dix mille spécimens étaient extraits chaque année des rivières de Bretagne par un seul pêcheur de perles : " Aux basses eaux, ils en bêchent donc le fond avec des pelles. Ce sont les valets de ferme et les meuniers qui se livrent de préférence à cette besogne et l'œuvre de destruction qu'ils accomplissent est inouïe. On nous a affirmé qu'un pêcheur dont on ne nous a pas dit le nom y capture bon an mal an, pour sa part, huit ou dix mille mollusques qu'il ouvre avec son couteau et dont, après examen, il abandonne les valves sur les rives. "

Les coquilles des grandes espèces de naïades (en particulier *M. auricularia*) étaient également utilisées pour la fabrication de boutons de chemise (Fig. 10). "Dans la région que la Charente arrose, (...) le massacre était considérable. Dans ce fleuve, les *Unio* étaient jadis nombreux à ce point que c'était par pleins bateaux que l'on emportait leurs coquilles pour les livrer aux fabricants de boutons de nacre." (Bonnemère 1901). Cet intérêt économique pour les naïades de Charente a du perdurer jusqu'aux années 1940 puisque d'après Faideau (1938), il a été demandé au ministre des finances l'installation d'une pêcherie de perles sur la Charente en 1937.

Il est difficile de mesurer précisément l'ampleur de ces prélèvements, mais ils ont certainement joué un rôle important dans la raréfaction des Margaritiferidae.



Figure 10 : coquille de Grande Mulette ayant servi à la confection de boutons.

⁷ " Tout le mérite en est dans la blancheur, la grosseur, la rondeur, le poli, le poids, toutes qualités qui ne se trouvent pas facilement réunies, à tel point qu'on ne rencontre jamais deux perles parfaitement semblables ; de là le nom d'unio (sans pareille) que leur a donné le luxe romain. Ce nom, en effet, ne se trouve pas chez les Grecs, et les barbares mêmes à qui nous devons les perles ne les appellent que margarites. "

Tableau 4 : récapitulatif des poissons-hôtes (espèces européennes uniquement) par espèce. I : infestation et production de juvéniles ; (I) : infestation sans production de juvéniles ; 0 : pas d'infestation malgré des expériences en condition contrôlées. (Sources : Huby, 1988 ; Araujo et al. 2000; Araujo et al. 2001; Araujo & Ramos, 2001; Araujo et al. 2003; Araujo et al. 2005; Lopéz et al. 2007; Araujo et al. 2009 ; Adam, 2010 ; Doua, et al. 2011 ; Lima et al. 2012) ; AnimalBase, <http://www.animalbase.uni-goettingen.de>, consulté en Mars 2013).

Espèces de poissons-hôtes potentielles	M. margaritifera	M. auricularia	P. littoralis	U. mancus	U. pictorum	U. tumidus	U. crassus	P. complanata	A. cygnaea	A. anatina	S. woodiana	TOTAL
Spirilin <i>Alburnoides bipunctatus</i> (Bloch, 1782)												1
Brème commune <i>Abramis brama</i> (Linnaeus 1758)												1
Esturgeon sibérien <i>Acipenser baeri</i> Brandt, 1869				(I)								1
Bélouga <i>Acipenser naccarii</i> Bonaparte, 1836												1
Esturgeon européen <i>Acipenser sturio</i> Linnaeus, 1758												1
<i>Achondrostoma oligolepis</i> (Robalo, Doadrio, Almada & Kottelat, 2005)												2
Ablette <i>Alburnus alburnus</i> Linnaeus, 1758	0											2
Anguille d'Europe <i>Anguilla anguilla</i> (Linnaeus, 1758)	0											0
Carpe à grosse tête <i>Aristichthys nobilis</i> Richardson, 1845												1
Barbeau de l'Ebre <i>Barbus graellsii</i> (Steindachner, 1866)	0											1
Barbeau <i>Barbus haasi</i> Mertens, 1925	0											1
Barbeau <i>Barbus</i> sp.												2
Brème bordelière <i>Blicca bjoerkna</i> (Linnaeus, 1758)												3
Poisson rouge <i>Carassius</i> spp												1
Poisson rouge <i>Carassius auratus</i> (Linnaeus, 1758)	0											0
Toxostome espagnol <i>Chondrostoma miegii</i> (Steindachner, 1866)												1
Toxostome <i>Chondrostoma</i> sp.												1
Loche espagnole <i>Cobitis paludicola</i> De Buen, 1930	0											1
Chabot commun <i>Cottus gobio</i> Linnaeus, 1758												3
Carpe de roseaux <i>Ctenopharyngodon idella</i> Steindachner, 1866												1
Carpe commune <i>Cyprinus carpio</i> Linnaeus, 1758	0			(I)								1
Grand Brochet <i>Esox lucius</i> Linnaeus, 1758												2
Gambusie <i>Gambusia holbrooki</i> Girard, 1859												2
Epinoche commune <i>Gasterosteus aculeatus</i> (Linnaeus, 1758)												6
Goujon <i>Gobio gobio</i> (Linnaeus, 1758)	0			(I)								3
Grémille <i>Gymnocephalus cernuus</i> (Linnaeus, 1758)												4
Saumon du Danube <i>Hucho hucho</i> (Linnaeus 1758)												1
Carpe argentée <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (Valenciennes, 1844)												1
Able de Heckel <i>Leucaspius delineatus</i> (Heckel, 1843)												1
Ide mélanote <i>Leuciscus idus</i> (Linnaeus, 1758)												2
Vandoise <i>Leuciscus leuciscus</i> (Linnaeus, 1758)												2
Mulet doré <i>Liza aurata</i> (Russo, 1810)	0											1
Barbeau espagnol <i>Luciobarbus bocagei</i> (Steindachner, 1864)												2
Muge <i>Mugil cephalus</i> Linnaeus, 1758	0											0
Carpe noire <i>Mylopharyngodon piceus</i> (J. Richardson, 1846)												1
Gobie à tâches noires <i>Neogobius melanostomus</i> (Pallas, 1814)												1
Truite arc-en-ciel <i>Oncorhynchus mykiss</i> Evermann, 1908												5
Toxostome <i>Parachondrostoma toxostoma</i> (Vallois, 1837)	0											0
Perche commune <i>Perca fluviatilis</i> Linnaeus, 1758												6
Vairon <i>Phoxinus phoxinus</i> (Linnaeus, 1758)												3
Vairon de l'Adour <i>Phoxinus bigerri</i> Kottelat, 2007												1
Epinocchette <i>Pungitius pungitius</i> (Linnaeus, 1758)												2
Toxostome ibérique <i>Pseudochondrostoma duriense</i> (M. M. Coelho, 1985)												2
<i>Pseudorasbora</i> <i>Pseudorasbora parva</i> (Temminck & Schlegel, 1846)												1
Bouvière <i>Rhodeus</i> spp.												1
Gardon <i>Rutilus rutilus</i> (Linnaeus, 1758)												3
Blennie fluviatile <i>Salaria fluviatilis</i> (Asso, 1801)												2
Truite fario <i>Salmo trutta</i> Linnaeus, 1758												6
Saumon atlantique <i>Salmo salar</i> Linnaeus, 1758												1
Omble de fontaine <i>Salvelinus fontinalis</i> (Mitchill, 1814)												1
Sandre <i>Sander lucioperca</i> (Linnaeus, 1758)												3
Rotengle <i>Scardinius erythrophthalmus</i> (Linnaeus, 1758)	0											4
Chevesne ibérique <i>Squalius alburnoides</i> Steindachner, 1866												2
Chevesne ibérique <i>Squalius carolitertii</i> Doadrio, 1988												2
Chevesne <i>Squalius (Leuciscus) cephalus</i> (Linnaeus, 1758)												5
Chevesne ibérique <i>Squalius pyreneicus</i> (Günther, 1868)												1
Tanche <i>Tinca tinca</i> (Linnaeus, 1758)	0											4
TOTAL	5	5	8	8	5	7	14	7	15	22	14	

I.3.1.5 La simplification taxonomique

Les naïades sont de grandes espèces, dont les coquilles sont faciles à récolter et qui ont attiré l'attention des collectionneurs et des naturalistes bien avant Linnée (Valedor de lozoya & Araujo 2011) mais plus particulièrement à partir de la moitié du XIX^e siècle. Etant extrêmement variables morphologiquement, elles ont été l'une des cibles favorites de la " Nouvelle Ecole ", qui a produit une quantité considérable de noms en comparaison des taxons considérés comme valides actuellement : Locard (1893) recense 900 espèces de bivalves dans les eaux douces de France (Fig. 11). Les principales révisions sont dues à Germain (1931), puis à Haas (1969). Les checklists produites par Falkner *et al.* (2002) puis par Gargominy *et al.* (2011) conservent globalement les taxons reconnus par Haas, avec des modifications nomenclaturales mineures (Fig. 11).

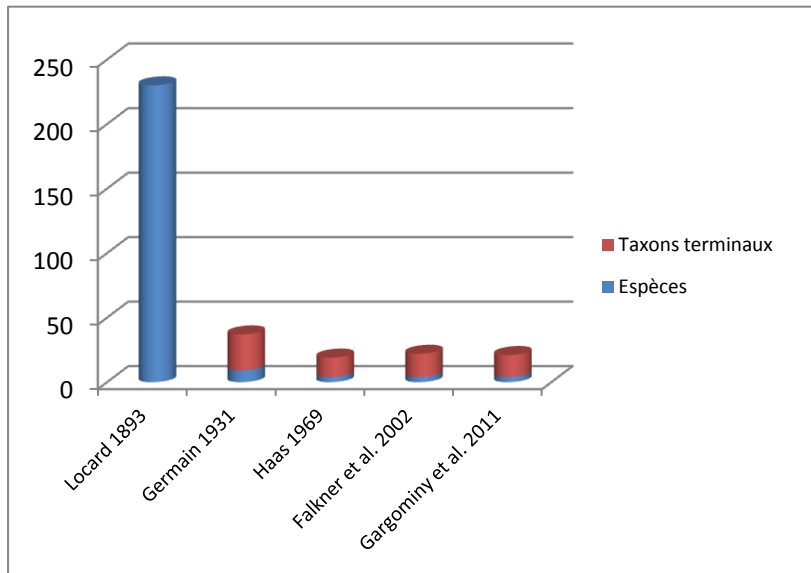


Figure 11 : évolution du nombre de taxons valides pour le genre *Unio* en France selon les différentes révisions et listes de référence. On note la proportion importante de taxons terminaux depuis Germain, qui témoigne de la gêne des différents réviseurs à déterminer le rang taxonomique des différentes formes observées en France.

I.3.2 Gastéropodes stygobies

I.3.2.1 Taxonomie

Les espèces de gastéropodes stygobies présentes dans les karsts du nord-montpelliérain appartiennent aux familles des Hydrobiidae Stimpson, 1865 (genres *Heraultiella*, *Fissuria* et *Islamia*), Amnicolidae Tryon, 1863 (genre *Bythinella*) et Moitessieriidae Bourguignat, 1863 (genres *Moitessieria*, *Henrigrardia*, *Paladilbia* et *Bythiospeum*). Ces genres sont exclusivement troglobies, mais certains taxons peuvent également se trouver dans le sous-écoulement des rivières (ou milieu hyporhéique), ce qui bouleverse l'échelle à laquelle doit être considérée l'insularité continentale : le sous-écoulement permet potentiellement aux mollusques de se disperser à l'échelle de tout le bassin-versant des fleuves côtiers, et non plus seulement à l'échelle des bassins-versants de sources. Les espèces des genres *Fissuria* et *Heraultiella* en particulier semblent adaptées particulièrement au milieu hyporhéique, puisqu'elles n'ont jamais été collectées en milieu souterrain. Les espèces des genres *Islamia* et *Moitessieria* sont fréquemment collectées en milieu hyporhéique, mais également au cœur des massifs karstiques. Enfin, les genres *Henrigrardia*, *Paladilbia* et *Bythiospeum* sont rare, sinon totalement absents, du milieu hyporhéique.

I.3.2.2 Histoires naturelles

La colonisation du milieu souterrain par les gastéropodes a vraisemblablement été itérative au sein des Hydrobiidae et des Amnicolidae à partir d'organismes dulçaquicoles (ex. Boeters 1979 ; Giusti & Pezzoli 1982 ; Bole & Velkovrh 1986 ; Boeters 1992 ; Velecka & Jüttner 2000 ; Hlavác 2002 ; Bichain *et al.* 2007a). Chez les Amnicolidae en particulier, des espèces telles que *Bythinella cebennensis* (Dupuy, 1851) présentent des formes souterraines, indifférenciables moléculairement des spécimens épigées, mais avec une morphologie très différente (Fig. 12).



Figure 12 : deux formes attribuables à *B. cebennensis*, toutes deux adultes comme le montre le développement évasé de l'ouverture. A gauche, une forme souterraine récoltée dans un des karsts les plus profonds de la vallée de l'Hérault (grotte du Sergent), à droite une forme typique de surface, récoltée au niveau de la résurgence de la Buèges (bassin de l'Hérault). Les analyses moléculaires (gènes COI, 16S et 18S) ne permettent pas de distinguer ces deux spécimens morphologiquement très éloignés. Echelle 2 mm.

L'origine des Moitessieriidae est inconnue. Les différentes phylogénies moléculaires produites (Wilke *et al.* 2001 ; Wilke *et al.* 2013) ne permettent pas d'identifier le groupe frère des Hydrobioïdes et des Moitessieriidae de manière soutenue. L'hypothèse d'une colonisation des eaux douces souterraines directement par des organismes marins n'est pas exclue : la crise messinienne (l'assèchement de la Méditerranée, il y a 6 à 5 millions d'années, avec une baisse du niveau de la mer estimée à 1500 à 2500 m en dessous du niveau actuel) pourrait, en même temps que l'enfoncement et la fragmentation des réseaux karstiques, avoir favorisé la colonisation du milieu souterrain (Malard, com. pers.).

I.3.2.3 Dispersion

Chez les gastéropodes, la dispersion est active puisque les animaux se déplacent. Toutefois, cette dispersion active reste très limitée (ex. Bahl *et al.* 1996). Les espèces vivant dans les cours d'eau subissent l'influence du courant, qui tend à entraîner les animaux vers l'aval. Pour ce qui est des organismes stygobies, la capacité de dispersion est contrainte (i) à l'amont par la zone vadose, ou zone sèche du karst, et (ii) à l'aval par la source, soit le jaillissement de l'eau à la lumière, des conditions environnementales très différentes, la compétition avec des espèces épigées et l'agression des ultra-violets. Toutefois, pour les espèces ayant la capacité de coloniser le sous-écoulement (la nappe d'eau courante située dans le lit des rivières, à l'abri de la lumière, qui constitue un milieu intermédiaire entre les eaux douces épigées et hypogées ; Gibert & Deharveng 2002), les échanges génétiques sont en théorie possibles à l'échelle du bassin versant de fleuve.

Le milieu souterrain est caractérisé par l'absence de lumière, donc l'absence de production primaire par voie de photosynthèse. L'essentiel de la matière organique soutenant la chaîne trophique est d'origine épigée, apportée principalement par des organismes troglaphiles ou troglaxènes, comme les chauves-souris, pour le milieu aérien ; et par l'infiltration des eaux météoriques, qui drainent avec elles des particules organiques, pour le milieu aquatique. La chaîne trophique est donc tronquée à la base par l'absence de producteurs primaires, et au sommet par la quasi-absence de prédateurs stricts (Gibert & Deharveng 2002).

I.3.2.4 De l'eau au robinet - qualité et quantité

Les enjeux concernant la ressource en eau potable sont grandissants, en particulier dans le sud de la France. Or la qualité de l'eau a fortement baissé en France, en raison principalement des rejets industriels, agricoles et domestiques (ex. Sabater 2008 ; Sabater & Tockner 2010). Des pollutions ponctuelles des eaux consommées par l'homme sont tolérées. Les marges de tolérance pour ce qui concerne les nitrates (NO_3) sont largement au-dessus des concentrations naturelles des cours d'eau : selon l'IFREMER, les taux de nitrates des rivières bretonnes ne devaient pas dépasser au maximum 3 à 4 mg/L dans les années 1900 (Menesguen 2003). Ils ont été multipliés par 10 en un siècle. On considère aujourd'hui qu'une eau contenant jusqu'à 50 mg/L de nitrates (NO_3) est potable (norme eau-du-robinet), mais on conseille d'éviter aux femmes enceintes et aux enfants une eau contenant plus de 25 mg/L de nitrates.

Les eaux souterraines n'échappent pas à l'omniprésence de l'homme. Pour ce qui concerne le sud de la France, les effluents viticoles sont les plus préoccupants. A l'aval des systèmes, les rejets domestiques deviennent très importants, au point que certaines espèces stygobies ont complètement disparu des stations historiques (ex. la station-type de *Heraultiella exilis*, à l'aval du Lez dans les canaux sur la commune de Lattes). La concentration en polluants augmente encore à la période estivale, du fait de l'étiage, accentué par l'affluence des touristes, et donc l'augmentation subséquente de la pression de prélèvement

des eaux souterraines. Elle s'accompagne d'une augmentation des rejets domestiques, qui se trouvent d'autant plus concentrés que les niveaux d'eau sont bas...

Les captages d'eau potable sont aujourd'hui protégés par des périmètres spécifiques définis dans le code de la santé publique (article L-1321-2). Ils ont été rendus obligatoires pour tous les ouvrages de prélèvement d'eau d'alimentation depuis la loi sur l'eau du 03 janvier 1992. Le périmètre de protection immédiate est clôturé et toutes les activités, hormis l'entretien du captage, sont interdites. Toute activité susceptible d'entraîner une pollution est interdite dans le périmètre de protection rapproché, qui fait en général quelques hectares, et vise à empêcher la migration de polluants vers l'ouvrage de captage. Le périmètre de protection éloigné, qui correspond à l'ensemble du bassin-versant du captage, est facultatif et rarement mis en œuvre concrètement. En effet, de telles mesures de protection auraient un impact économique conséquent : les surfaces concernées seraient telles qu'elles empêcheraient les activités humaines polluantes (quelles soient domestiques, agricoles ou industrielles) à très grande échelle.

Les karsts du nord-montpelliérain sont toutefois globalement épargnés par l'influence des activités humaines : leurs bassins versants sont essentiellement constitués de surfaces d'élevage extensif, la densité d'habitations est faible et les industries quasi-inexistantes. Les eaux souterraines sont donc globalement de bonne qualité (Portail national d'accès aux données sur les eaux souterraines, <http://www.adès.eaufrance.fr/>, consulté en 2012). En revanche, les prélèvements sont importants, en particulier sur la source du Lez, qui alimente la ville de Montpellier à 80%.

Les nappes souterraines subissent naturellement des fluctuations, au rythme des saisons. Le niveau d'étiage est encore abaissé par les pompages d'origine humaine, pour l'irrigation et l'adduction en eau potable (AEP). En période estivale, la demande est plus importante d'une part parce que la consommation par habitant augmente, d'autre part en raison de l'afflux touristique. Le principe de "gestion active" consiste à pomper plus d'eau en été que ce que l'aquifère peut fournir, la recharge hivernale permettant de retrouver le niveau initial. Il a été mis en œuvre sur la source du Lez dès 1965, en rabattant le niveau de la vasque de 6,50 m, ce qui a permis de pomper 800 L/S pendant toute la période estivale. A la suite de travaux menés dans les années 1960-1970 (Paloc 1979 ; Avias 1995), quatre forages ont été implantés au niveau du conduit à l'amont direct de la source, permettant ainsi de pomper jusqu'à 1700 l/s. Les pompes sont situées à une profondeur de 48 m en-dessous du niveau de la source (Dörfliger 2008). Pendant toute la période estivale, le débit naturel de la source est inférieur au débit pompé, et un débit réservé est rejeté dans le fleuve à l'aval de la vasque. Le débit réservé est fixé à 160 l/s par la déclaration d'utilité publique du 5 juin 1981. Une étude est actuellement en cours, commandée par la ville de Montpellier, pour évaluer les possibilités d'augmenter encore les pompages et donc de rabattre d'autant le niveau de la nappe en période estivale.

Si les précipitations hivernales ont permis jusqu'à présent de recharger complètement l'aquifère, en limitant au passage les dégâts causés par les crues autrefois spectaculaires du Lez, l'ampleur des fluctuations du niveau de l'eau pourrait avoir des conséquences sur l'écosystème souterrain. Rien n'est connu de l'impact que pourrait avoir la gestion active sur la biodiversité des karsts nord-montpelliérain. En tout état de cause, les espèces crénicoles décrites au XIX^e siècle de la source du Lez ont disparu de cette station, puisque cette source n'est plus pérenne (Prié 2003). Les *Bythinella* souterraines ont été récoltées vivantes uniquement à faible profondeur (Bichain *et al.* 2004 ; Prié & Bichain 2009). *Bythinella entrephea* (Paladilhe, 1867), endémique du karst du Lez, n'a jamais été retrouvée vivante en dépit de l'important effort de prospection et pourrait bien avoir pâti des effets corollaires de la gestion active.

1.3.2.5 L'inflation taxonomique

Le milieu souterrain est souvent difficile, généralement impossible d'accès pour l'homme. En conséquence, la faune qu'il héberge est largement méconnue. Les observations de gastéropodes stygobies se limitent généralement aux coquilles récoltées aux exutoires (sources) ou dans le sous-écoulement, rarement à la capture de quelques individus vivants. Près de la moitié des espèces décrites n'a jamais été observée vivante (Bertrand 2004).

L'engouement de quelques malacologues pour cette manne d'espèces nouvelles cachées au sein de ces milieux restés sous-prospectés est à l'origine d'une production importante et parfois anarchique de nouveaux noms. La liste de référence de 2011 (Gargominy *et al.* 2011) met en évidence cette augmentation récente du nombre de taxons valides due principalement aux nouvelles espèces d'Hydrobioides décrites au cours des 20 dernières années (Fig. 13).

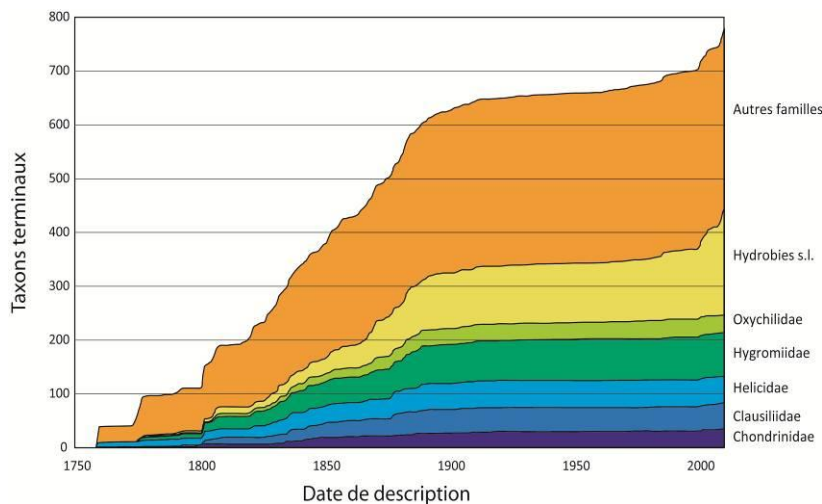


Figure 13 : illustration de l'inflation taxonomique actuelle, due principalement aux nouvelles espèces d'hydrobioides décrites. Les mollusques stygobies forment une part majoritaire de ces descriptions récentes. Illustration tirée de Gargominy *et al.* (2011).

I.4 METHODES D'INVESTIGATION ET D'ANALYSES

I.4.1 Périmètre d'étude et sites échantillonnés

Le périmètre d'étude des naïades est la France métropolitaine, Corse incluse (Fig ; 14). Le choix de cette zone d'étude est en partie opportuniste, puisque c'est la zone d'influence privilégiée du bureau d'études Biotope, et en partie guidé par l'homogénéité : la France constitue une entité hydrologique cohésive, isolée de la péninsule ibérique par les Pyrénées, de l'Europe au Sud-Est par les Alpes et au Nord-Est par la "Blue Banana", la zone la plus anthropisée d'Europe (voir ARTICLE 7). Elle est de plus à la croisée des influences méditerranéennes, avec des espèces telles que *U. mancus* et *P. littoralis* qui ont leur limite nord-est d'aire de répartition en France ; et des influences continentales avec des espèces telles que *U. crassus*, *U. tumidus* ou *U. pictorum* dont les limites d'aire de répartition au sud-ouest sont en France.

L'échantillonnage a été en grande partie opportuniste, financé par les études d'impact obtenues par Biotope. Un échantillonnage systématique, ciblé sur les stations type a également été réalisé pour compléter le jeu de données (notamment pour la Corse et les stations type des différentes sous-espèces d'*U. mancus*).

Le périmètre d'étude des mollusques stygobies a été restreint aux karsts du nord-montpelliérain, soit les bassins versants de l'Hérault, du Lez et du Vidourle (Fig. 15). Le choix de cette zone d'étude a été guidé par la recherche d'une homogénéité de milieux : le milieu souterrain est fondamentalement fragmenté (Culver & Sket 2000 ; Ferreira 2005 ; Lefébure *et al.* 2006b, c). Une étude à l'échelle de la France se serait inévitablement confrontée à l'isolement des grands massifs karstiques, comme en témoigne l'hétérogénéité constatée des faunes entre les grands massifs (Gibert 2001 ; Ferreira 2005). On aurait alors pu discuter de l'insularité continentale à une autre échelle, mais pas à une résolution propre aux hydrosystèmes. Les karsts du Nord-montpelliérain constituent une entité cohésive au sein de laquelle une grande diversité d'espèces est décrite au point que cette zone figure parmi les hotspots mondiaux de biodiversité souterraine (Malard *et al.* 1997a ; Culver & Sket 2000). Ils sont divisés entre plusieurs hydrosystèmes fluviaux supposés indépendants (fleuves côtiers méditerranéens : Rhône, Vidourle, Lez, Hérault) ; subdivisés en zones hydrographiques définies comme des bassins-versants de sources indépendants les uns des autres (voir SANDRE 2007). Ils constituent donc une zone d'étude idéale pour tester la corrélation entre variabilité génétique et structure biogéographique.

L'échantillonnage est ici contraint par l'accessibilité au milieu souterrain.

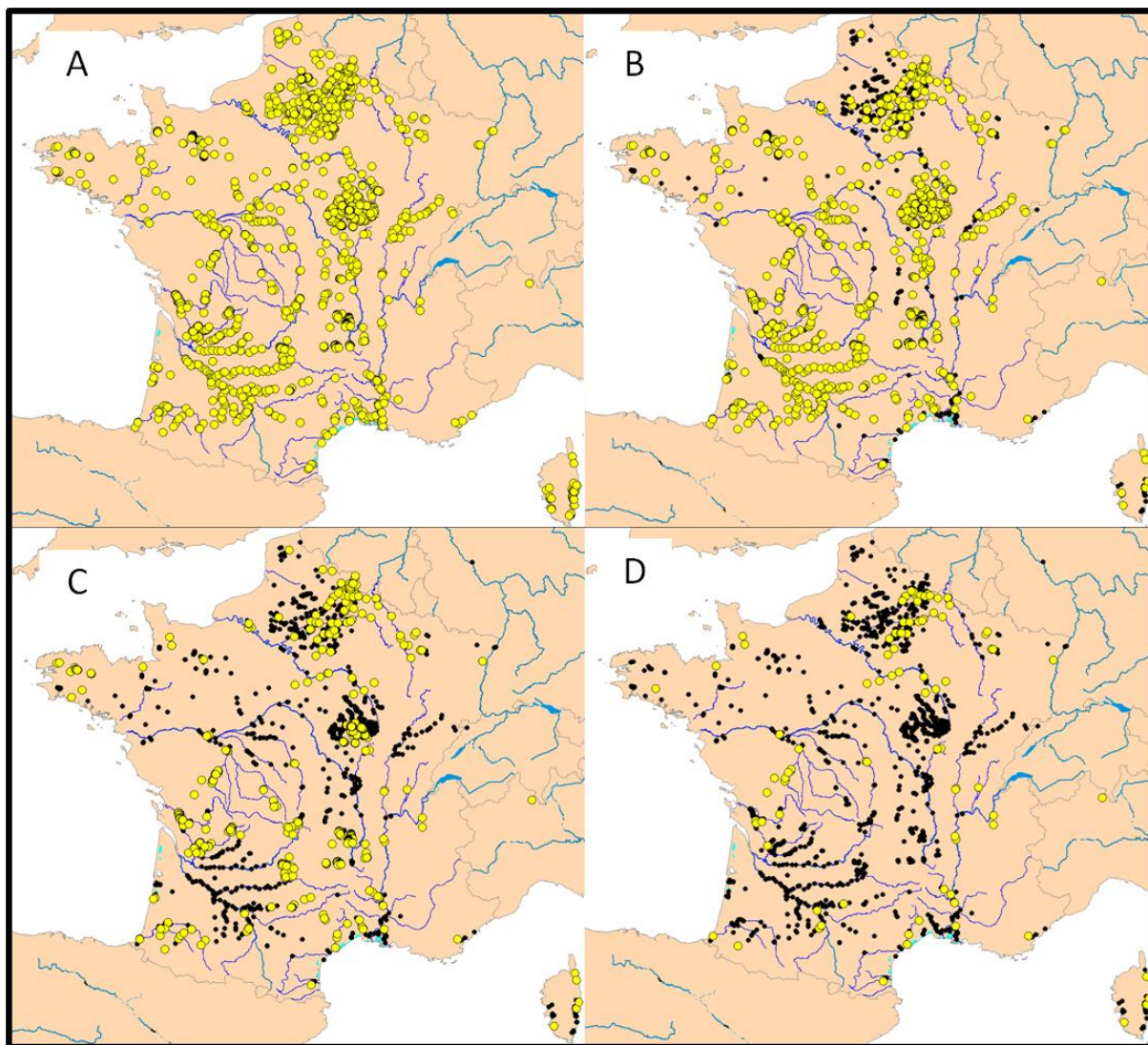


Figure 14 : carte de l'échantillonnage pour les naïades de France. La qualité de l'échantillonnage dépend des objectifs : A : ensemble des données collectées, y compris les données historiques et bibliographiques ; B : données récentes uniquement ; C : populations vivantes uniquement ; D : populations échantillonnées pour analyses génétiques uniquement. Pour chaque cas de figure, les ronds jaunes représentent les données disponibles ; les points noirs rappellent la totalité des données compilées.

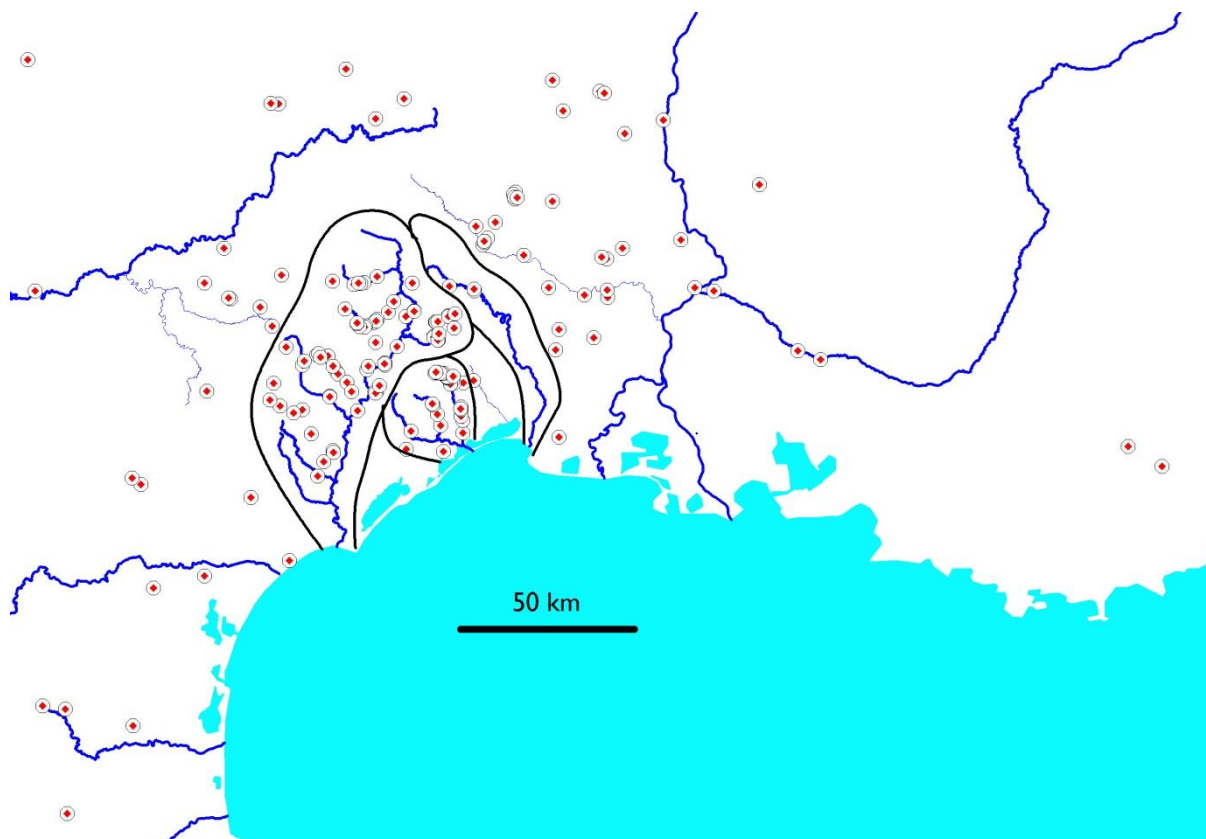


Figure 15 : carte de l'échantillonnage pour les mollusques stygobies (données bibliographiques incluses). Les lignes noires figurent les trois principaux bassins-versants étudiés, soit l'Hérault à gauche, le Lez au centre et le Vidourle à droite.

1.4.2 Méthodes d'échantillonnage

Les bureaux d'études n'ont pas obligation de résultats, mais ont obligation de moyens. La qualité de leur prestation est garantie par la mise en œuvre de tous les moyens d'investigation possibles, et la mise en concurrence encourage le développement de méthodes innovantes. Dans le cadre de ce travail, j'ai donc utilisé toutes les méthodes classiques de récolte des mollusques (collecte à vue, dragage, récolte de sédiment au niveau des sources...) mais j'ai aussi cherché à tester des méthodes nouvelles pour la prospection des milieux aquatiques difficiles d'accès.

1.4.2.1 Rivières

Les principaux obstacles à la prospection des rivières sont la visibilité et la profondeur.

A faible profondeur et quand le substrat est minéral, les prospections à pied à l'aide d'un aquascope sont les plus efficaces. **L'aquascope** permet de s'affranchir de la réverbération et de la distorsion optique due au changement de milieu (air *vs* eau), il offre un angle de vue important et il est ergonomique. C'est l'outil le plus largement utilisé pour la recherche des naïades (Fig. 16A). Pour des profondeurs intermédiaires, ou lorsque le substrat est vaseux, l'utilisation d'un masque et d'un tuba permettent à la fois de survoler le lit sans troubler les eaux et d'effectuer des plongées en apnée. Dans le cas de rivières très turbides, la méthode de recherche au toucher est employée : on malaxe la vase jusqu'à rencontrer occasionnellement des bivalves, à la manière des rats-laveurs. Cette méthode présente des risques (tessons de bouteilles, morceaux de fer rouillés). Il est préférable de porter des gants pour des raisons de sécurité, mais l'acuité tactile s'en trouve alors amoindrie... Pour répondre à ce cas de figure, j'ai testé l'utilisation de la tellinière. La **tellinière** est un outil traditionnel languedocien utilisé pour la récolte des Tellines (genres *Apolymetis*, *Donax*, *Macoma*, *Tellina*) dans les zones de faible profondeur de l'estran. La tellinière est particulièrement efficace en rivière quand les conditions de visibilité sont mauvaises (Fig. 16B). A l'instar d'une drague, son emploi facilite la standardisation des protocoles d'échantillonnage puisque la surface échantillonnée est déterminée par celle du filet multipliée par la longueur du trait dragué et que l'opérateur échantillonne le substrat à l'aveugle. Quand la profondeur proscriit l'utilisation de la tellinière ou de l'aquascope, il est nécessaire d'avoir recours soit au dragage, soit à la plongée.

Le **dragage** des rivières est difficile à mettre en œuvre. Il nécessite l'utilisation d'un bateau, de puissance suffisante pour tirer la drague. La drague ne peut être manipulée que dans des espaces aquatiques dégagés et horizontaux, ce qui exclut les berges et leurs abords, qui sont les secteurs les plus favorables aux naïades puisque le substrat est plus stable. Le risque qu'elle se coince dans des arbres morts ou tout des déchets d'origine anthropique (carcasses de voitures, épaves, tuyaux, etc.) est important, en particulier à l'aval des cours d'eau. Enfin, l'utilisation d'une drague impacte le lit des cours d'eau, par exemple sur les zones de frayère, et cet impact peut être répréhensible au regard de la loi.

La **plongée** (Fig. 16C) est apparue comme le moyen le moins impactant de prospecter les cours d'eau profonds. Outre la difficulté de mise en œuvre au point de vue logistique (regonflage des blocs pour des missions de longue durée, contraintes liées à la sécurité, accès aux cours d'eau plus difficile en raison du transport du matériel, retour au point de départ en tenant compte du courant ou utilisation d'une barge...), la pratique de la plongée dans le cadre professionnel est soumise à une réglementation qui impose une certification. J'ai donc du passer ma certification de plongeur professionnel pour pouvoir mener des études en milieu hyperbare dans le cadre professionnel. La prospection en plongée nécessite aussi de s'entourer des compétences d'autres plongeurs professionnels pour être en règle avec la réglementation actuelle (qui n'est d'ailleurs pas vraiment adaptée aux plongées en rivière). En rivière mais surtout en milieu souterrain, l'appui d'un binôme a été un des piliers du travail de terrain, que ce soit pour assurer ma sécurité ou pour l'appui logistique (camion équipé, matériel de secours, compresseur, matériel de sécurité...). Au-delà des remerciements que je leur dois, j'insiste sur la pertinence de travailler en partenariat avec des professionnels de la plongée et des sports de plein air. Des solutions techniques à des difficultés de terrain ont pu être trouvées grâce à leurs compétences, qui ne se trouvent pas nécessairement dans les universités ou les bureaux d'études : aménagement d'un camion pour transporter les plongeurs, le matériel et les échantillons ; développement de techniques de progression sur cordes, sur et sous l'eau ; adaptation du petit matériel pour les exigences du biologiste (quadrats et transects sub-aquatique, prise de notes) ; localisation du plongeur et des sites d'acquisition des données pour le SIG...

La traçabilité de tous les spécimens de naïades collectés est assurée par la mise en collection au MNHN. Un numéro d'inventaire MNHN issu de la base de données INVMAR (voir http://collections.mnhn.fr/wiki/Wiki.jsp?page=Schema_Invmar) a été attribué à chacun des spécimens. Les coquilles ont été séchées et portent, au marqueur indélébile à l'intérieur de la valve droite, le numéro de ma base de données personnelle, numérotée de 1 à 582 (voir ANNEXE I pour la correspondance entre n° de ma base de données et n° MNHN). Cette dernière inclut les échantillons d'animaux relâchés vivants, aussi tous les individus de cette base ne correspondent pas à des numéros MNHN. En revanche la réciproque est vraie. Les tissus ont été conservés séparément dans de l'alcool à 90° et sont numérotés par une étiquette portant le numéro d'inventaire MNHN. Quelques échantillons de tissus non liés à des spécimens euthanasiés ont été intégrés dans les analyses moléculaires ; ils ne portent pas de numéro MNHN. De même, dans le cadre d'une étude de génétique des populations, de nombreux spécimens d'*U. crassus* ont été échantillonnés soit à l'aide d'écouvillons, soit en prélevant un morceau de chair, et ces spécimens ne figurent pas en collection non plus. Enfin, aucun spécimen de *Margaritifera* n'a été prélevé dans le cadre de ce travail. Des morceaux de manteau ou de pieds ont été prélevés pour les séquences présentées ici, mais l'intégralité du matériel a été utilisée pour les extractions et il n'y a aucun spécimen en collection.

Figure 16 (page suivante) : quelques méthodes pour la recherche des bivalves d'eau douce. A : l'aquascope est la méthode la plus populaire, principalement utilisée pour rechercher la moule perlière dans les têtes d'eau limpides et peu profonde des cours d'eau. B : la tellinière, outil traditionnel languedocien utilisé en milieu marin, a été adaptée pour la prospection des rivières turbides et peu profondes. C : la plongée reste le seul moyen de prospection adapté pour toutes les circonstances. Elle est en revanche lourde à mettre en œuvre, nécessite un appui logistique pour le transport des plongeurs, des qualifications en particulier dans le cadre professionnel, et présente des risques en particulier liés au courant (progression des plongeurs, objets dérivants) et à la turbidité (orientation, risques de s'empêtrer dans les branchages). D : quelque soit la méthode employée, l'échantillonnage est limité par les conditions d'accessibilité et/ou de visibilité, comme ici sur l'Aisne.



I.4.2.2 Réseaux souterrains

Les méthodes traditionnelles d'échantillonnage des gastéropodes stygobies sont en premier lieu la collecte de sédiment au niveau des sources ou des cavités. La recherche à vue dans les cavités est peu utilisée, puisqu'elle nécessite des conditions de faible profondeur, ce qui est rarement le cas en milieu souterrain (mais voir Bichain *et al.* 2004, Prié & Bichain 2009). Les filets phréatobies (Fig. 17 A, B) et la pompe à air-lift (Fig. 17E) sont utilisés principalement pour la récolte des crustacées (ex. Malard *et al.* 1997 a, b ; Gibert 2001 ; Olivier *et al.* 2006) mais peuvent également fournir du matériel au malacologue.

Pour l'échantillonnage du milieu hyporhœique, la pompe Bou-Rouch (Bou & Rouch, 1967) reste la méthode la plus adaptée, notamment pour les mollusques (Fig. 17D).

Que ce soit en milieu souterrain ou au niveau des sources, j'ai prélevé des quantités de sédiment variant entre 5 et 25 L par station. Les prélèvements quantitatifs sont difficiles à mettre en œuvre pour la faune stygobie. En effectuant des prélèvements itératifs dans le temps (entre 2003 et 2012) et dans l'espace (différents accès à une même nappe d'eau), j'ai observé que 5 l. de sédiment tamisé par une maille de 5 mm permettent de récolter la totalité des espèces présentes, sans singletons (voir Prié 2008).

La pompe Bou-Rouch et les filets dérivants ont été utilisés en milieu souterrain comme au niveau des exutoires (et dans le lit des rivières pour la pompe Bou-Rouch). Si cette dernière s'est révélée peu efficace en milieu souterrain, les filets dérivants ont permis de récolter des animaux vivants de manière très efficace en milieu souterrain, notamment en remuant le substrat en amont de la pose des filets. En revanche, des filets dérivants posés à la sortie de pompes n'ont pas permis de collecter de gastéropodes stygobies : ni au niveau du pompage de la source du Lez, où un filet dérivant a été posé pendant six mois ; ni lors d'un pompage forcé dans les Pyrénées-Orientales, où les rejets ont été intégralement filtrés pendant deux semaines.

Le piégeage à l'aide de nasses ou de carrelets appâtés avec des matières végétales ou des morceaux de viande a été testé mais ne m'a pas fourni de résultats concluants.

La plongée a encore une fois été la meilleure méthode d'approche du milieu souterrain. D'une part, j'ai sollicité les compétences de plongeurs spéléologues, qui ont, lors de leurs explorations, rapporté du matériel parfois inédit. D'autre part, j'ai sollicité leurs compétences pour m'encadrer lors de plongées exploratoires réalisées hors du contexte du bureau d'études (la législation concernant la plongée souterraine dans le cadre professionnel est tellement contraignante qu'elle exclue sa pratique par les bureaux d'études). J'ai ainsi pu me concentrer pleinement à la collecte de mollusques stygobies sans me soucier des aspects liés à la sécurité (réserve d'air, orientation, profondeur, turbidité...). Encore une fois, déléguer ces aspects techniques à un binôme m'a permis de me rapprocher des conditions de prélèvement que l'on rencontre habituellement dans des milieux accessibles.

J'ai utilisé la pompe à air-lift pour échantillonner les piézomètres. Le principe consiste à injecter de l'air comprimé dans un tuyau ouvert au sein d'une canalisation verticale ouverte dans le piézomètre (Fig. 17 E), air qui va remonter dans le tuyau en se dilatant et entraîner des portions de la colonne d'eau vers la surface. On utilise généralement un compresseur pour alimenter la pompe en air comprimé. J'ai branché la pompe sur une bouteille de plongée, pour prélever à l'intérieur des forages du BRGM qui sont parfois difficiles d'accès. La profondeur de la nappe était généralement trop importante par rapport au niveau du sol pour que la pompe à air-lift fonctionne. Il faut en effet que le tuyau soit immergé aux deux tiers pour que la pompe fonctionne. Nos aquifères étant généralement situés à plus de 30m de la surface, la pompe à air-lift a rarement donné de bons résultats.

Les spécimens collectés sont dans la grande majorité des coquilles qui n'ont pas encore été mises en collection. Les spécimens collectés vivants ont été immergés dans de l'eau bouillante pendant quelques secondes, de manière à empêcher la fermeture hermétique de l'opercule, puis plongés dans de l'alcool à 90° non dénaturé. Dans la très grande majorité des cas, il n'a pas été possible de les extraire de leur coquille et les échantillons ont été détruits lors de l'extraction. Des photos ont été prises avant destruction de chacun des spécimens. Ces photos sont de qualité variable parce que j'ai évité au maximum le dessèchement des spécimens ainsi que leur exposition à la lumière.

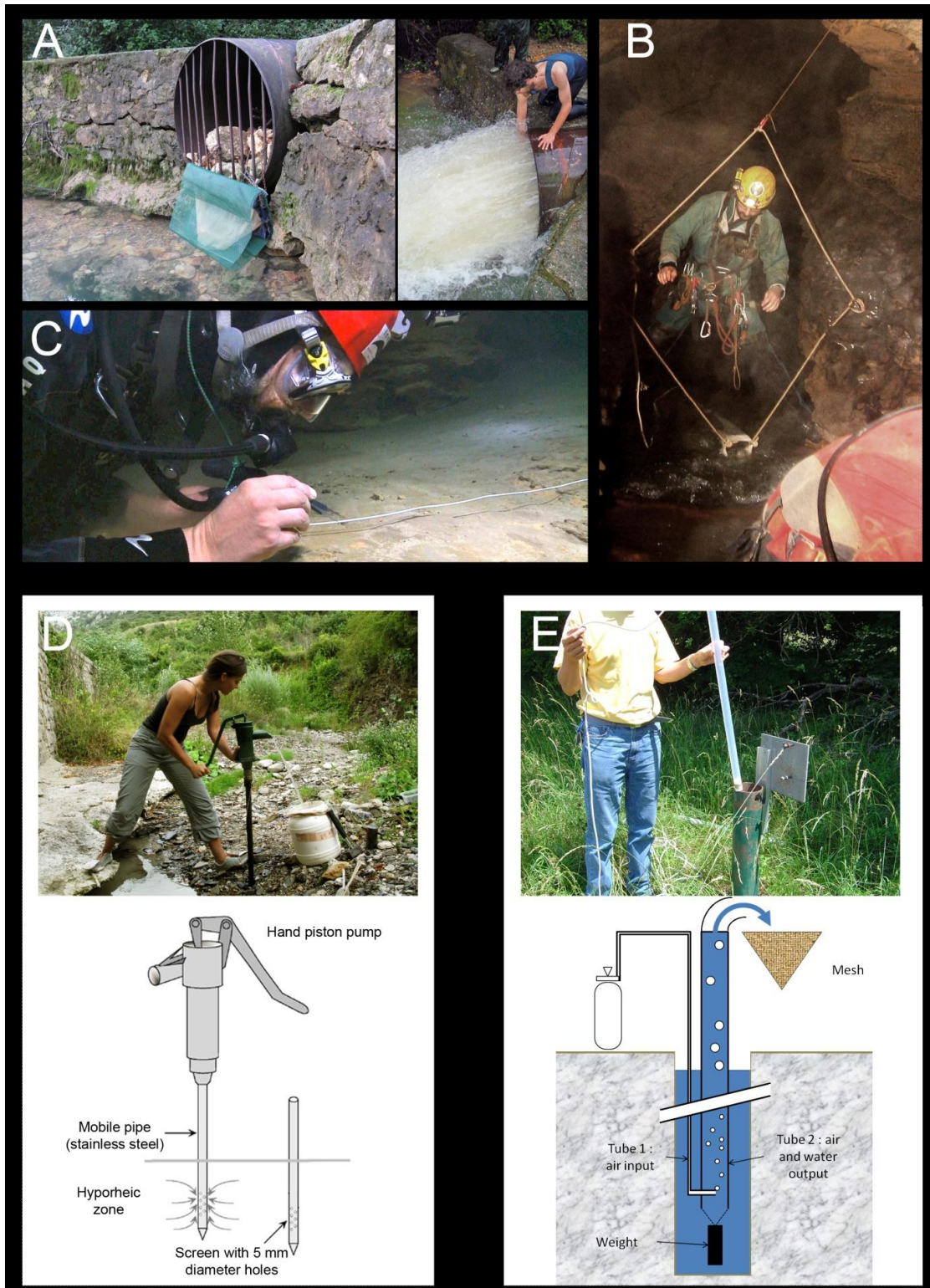


Figure 17 : A : les filets phréatobies donnent les meilleurs résultats au moment des crues automnales. Ils sont posés à l'étiage et relevés pendant les crues, pour collecter des animaux vivants ejectés par la puissance du courant. B : les filets phréatobies sont également efficaces en milieu souterrain, en particulier quand la progression des spéléologues à l'amont perturbe le lit des cours d'eau et met en suspension matière organique, fines et animaux. C : les prospections à vue en plongée spéléo nécessitent une logistique importante et un accompagnement pour des questions évidentes de sécurité. Ce fonctionnement en binôme a donné d'excellents résultats dans la grotte de Sauve. D : la pompe Bou-Rouch (en haut illustration dans un affluent de l'Ardèche, en bas fonctionnement théorique) permet d'accéder au sous-écoulement des rivières et d'échantillonner la faune hyporhéique. E : les piézomètres (en haut) peuvent fournir un accès artificiel au réseau souterrain impénétrable (anfractuosités de la roche). La pompe à air-lift (en bas) permet de faire remonter des portions de la colonne d'eau qui sont ensuite filtrées pour collecter des gastéropodes stygobies.

1.4.3 Morphométrie des coquilles

I.4.3.1 Gastéropodes stygobies

La morphométrie des mollusques souterrains a été réalisée à partir de photos. Les coquilles ont été positionnées de manière standard sur un support adhésif du sable fin ou de la pâte à modeler. Les images ont été prises à l'aide d'une loupe trinoculaire (voir Prié & Bichain 2009 pour le détail des méthodes de numérisation). Une échelle est présente sur chaque photo, posée côté de la coquille. Les images ont ensuite été pivotées à l'œil à l'aide du logiciel Photoshop CS3 v. 10.1.1, de manière à ce que l'axe de la columelle soit parfaitement vertical. Des tests effectués lors d'un travail de Master (Prié, 2006) ont montré que le positionnement à l'œil était suffisamment fiable. Neuf points homologues ont été disposés sur l'image de la coquille à l'aide du logiciel Image Tool version 3.0 (Wilcox *et al.* 2002). Sept mesures ont été déduites des coordonnées des points homologues (Fig. 18). Les distances entre ces points ont ensuite été calculées à partir des coordonnées de chaque point. De la même manière, des points ont été positionnés de part et d'autre de l'échelle, de manière à la remesurer sur chaque image. Les valeurs de conicité (H/L ; H/LdT) ainsi que la profondeur de la dernière suture (LdT-LdS) et la rondeur de l'ouverture (Ho/Lo) ont été déduites des mesures prises et intégrées à la matrice. Les valeurs biométriques en pixels ont été transformées en mesures (mm), puis log-transformées de manière à s'affranchir de l'effet taille. La matrice totale a été traitée avec une Analyse en Composantes Principales (ACP).

Les spécimens juvéniles, cassés ou malformés n'ont pas été intégrés à la matrice de mesures.

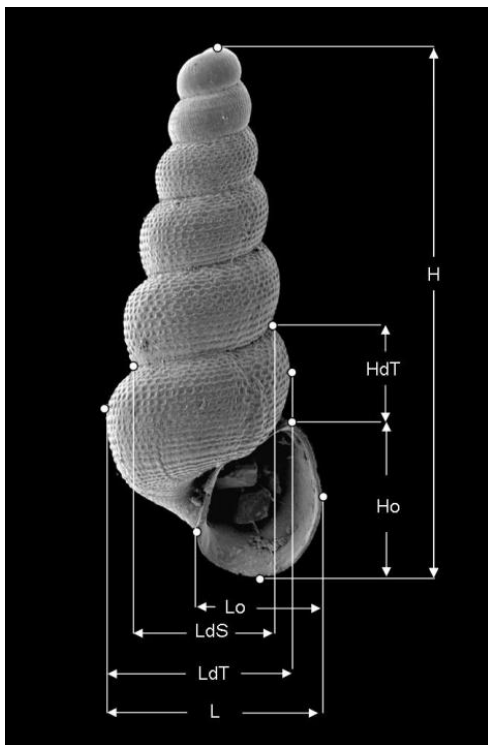


Figure 18 : positionnement des points homologues sur une photo de coquille et mesures déduites de leurs coordonnées. H : hauteur totale ; HdT : hauteur du dernier tour ; Ho : hauteur de l'ouverture ; Lo : largeur de l'ouverture ; LdS : largeur de la dernière suture ; LdT : largeur du dernier tour ; L : largeur totale.

I.4.3.2 Naïades

La numérisation des points homologues visibles à l'intérieur de la valve droite et des contours a été réalisée à l'aide d'une table de mesure par vidéo et du logiciel de métrologie InSpec disponibles à la plateforme de morphométrie du MNHN.

Quatre points homologues ont été définis à l'intérieur de la valve : l'umbo, l'extrémité de la dent latérale, la jonction de la ligne palléale avec l'insertion du muscle adducteur postérieur et la jonction de la ligne palléale avec l'insertion du muscle adducteur antérieur (Fig. 19). Le départ du contour a été positionné *a posteriori* à l'endroit du contour le plus proche de l'umbo.



Figure 19 : Positionnement des quatre points homologues à l'intérieur de la valve droite. A : umbo ; B : extrémité de la dent latérale ; C : insertion de la ligne palléale avec l'empreinte du muscle adducteur postérieur ; D : insertion de la ligne palléale avec l'empreinte du muscle adducteur antérieur.

Les coquilles ont été positionnées sur de la pâte à modeler et ajustées à l'aide d'un niveau à angle droit, de manière à ce que la surface de la valve soit parfaitement horizontale. L'erreur de mesure a été estimée en mesurant 10 fois de suite cinq coquilles morphologiquement proches. Cette erreur de mesure est négligeable tant la machine fournit des valeurs précises pour des objets de cette taille. Le nombre d'harmoniques a été fixé à 30 (Fig. 20), nombre qui a permis de retracer fidèlement le contour. Cinquante six spécimens correspondant à la sous-espèce *U. c. courtillieri* et 30 spécimens correspondant à *U. c. crassus* ont ainsi été digitalisés (Fig. 21 ; voir chapitres suivants pour la détermination moléculaire des deux sous-espèces).

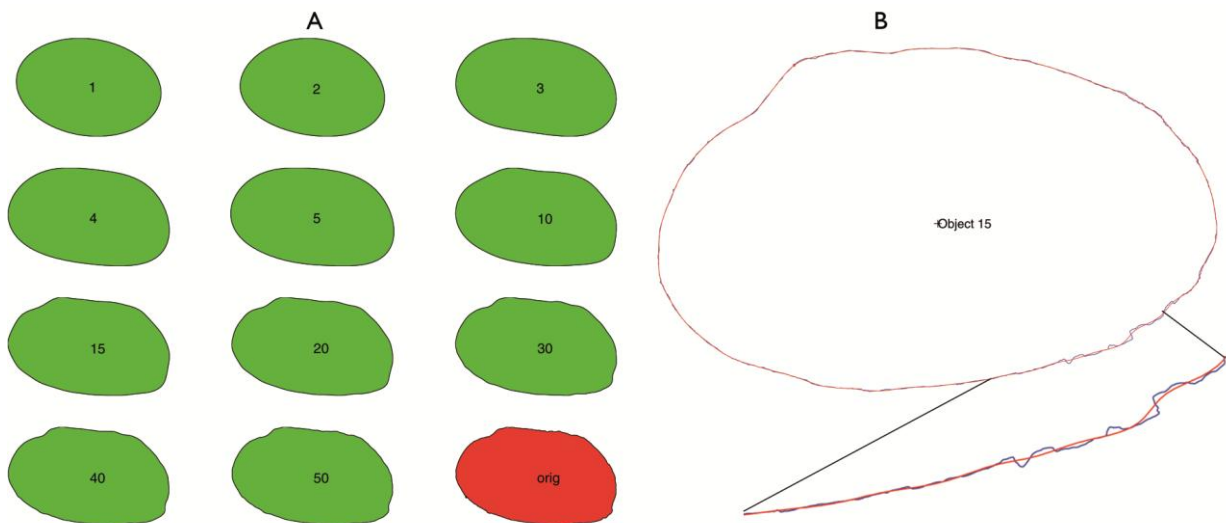


Figure 20 : A : reconstruction du contour avec un nombre croissant d'harmoniques. Une seule harmonique fournit une approximation insuffisante ; 50 harmoniques permettent de reproduire fidèlement l'original. Pour réduire les temps de calcul, nous avons choisi de limiter les analyses à trente harmoniques, valeur consensuelle qui fournit une représentation assez fidèle de l'originale (B : détail des contours, en bleu le contour original, en rouge le contour retrace par les 30 harmoniques).



Figure 21 : numérisation des spécimens moléculairement attribués à *U. c. crassus* et *U. c. courtillieri*. La ligne bleue représente le contour (le rond bleu figure le départ du contour, soit le point du contour situé au plus près de l'umbo), la ligne rouge rejoint les points homologues, soit l'umbo, l'extrémité de la dent latérale et l'insertion de la ligne palléale dans la marque des muscles adducteurs

Les résultats ont été traités directement par une ACP, puis en utilisant le package MClust implémenté dans R (cette analyse vise à maximiser le regroupement des individus en faisant en sorte que les variables des différents groupes suivent au mieux une loi normale).

Biométrie

Par ailleurs, la numérisation a fourni les valeurs de périmètre et de superficie de la valve. Les mesures d'épaisseur et de longueur du ligament, mesurées au pied à coulisse, ont été ajoutées à la matrice. Toutes ces mesures ont été log-transformées de manière à normaliser les mesures des individus par la taille, puis traitées par une autre ACP.

1.4.4 Analyses moléculaires

I.4.4.1 Prélèvements de tissus

Dans la majeure partie des cas, un morceau du pied a été prélevé, soit sur des individus vivants qui ont été relâchés (*M. auricularia* et *M. margaritifera*), soit sur les individus euthanasiés. Pour 10 spécimens, un morceau de la cténidie a été extrait et amplifié. Les échantillons de tissus ont été conservés dans de l'alcool à 90° non dénaturé. Dans la majeure partie des cas, les échantillons de tissus ont été fixés sur le terrain, ce qui améliore le rendement lors de l'extraction (Soroka 2010).

Dans l'optique de trouver des méthodes non vulnérantes, des tests ont été effectués à partir de prélèvement de périostacum au niveau du bord de la coquille sur *M. margaritifera* (en provenance de la Truyère) et *M. auricularia* (en provenance de la Vienne), mais je n'ai pas pu amplifier d'ADN à partir de ces prélèvements. Des prélèvements par frottis à l'intérieur des bivalves à l'aide d'écouvillons ont également été testés. Les résultats ne sont pas satisfaisants, avec seulement 30% des échantillons qui ont pu être amplifiés par la société Genoscreen (voir § I.4.5.2), avec qui nous avons mis au point cette technique de prélèvements.

Deux outils ont été utilisés pour effectuer des prélèvements de chair : la pince d'ouverture, matériel utilisé en perliculture et qui permet d'ouvrir les valves de manière plus douce qu'à la main, en évitant la luxation des muscles adducteurs ; et la pince à biopsie, matériel gynécologique tout à fait approprié aux prélèvements de chair des moules (Fig. 22). Les prélèvements d'un morceau de pied sont jugés non-létaux et sont utilisés par la grande majorité des auteurs cités. Le prélèvement d'un morceau du manteau n'est pas léthal non plus, mais pourrait à terme causer des malformations de la coquille : la cicatrice au niveau de la partie prélevée pourrait handicaper localement la production du calcaire de la coquille (Altaba com. pers.).

Les résultats sont similaires entre les échantillons de pied et de cténidies. Les tests effectués à la recherche de méthodes non vulnérantes de prélèvements, soit ici le bord de la coquille et les écouvillons, n'ont pas été concluants. Geist *et al.* (2009) effectuent des prélèvements sanguins à l'aide d'une seringue, méthode

qui semble donner de très bons résultats, mais présente le risque d'atteindre des organes vitaux lors du prélèvement.



Figure 22 : deux outils permettant d'effectuer des prélèvements de tissus de bivalves sans traumatisme. A gauche la pince à moules qui sert à entrouvrir les valves, à droite la pince à biopsie qui permet de prélever un petit morceau de pied.

I.4.4.2 Extractions, amplifications, séquençage

Dans le cadre de ce travail, les analyses génétiques ont été considérées comme un outil et non comme une fin de recherche en soit. Les extractions, amplification et séquençages ont pour l'essentiel été déléguées à des entreprises privées (Genoscreen et Eurofins). Le paragraphe 1.4.5 détaille la démarche et les résultats de la sous-traitance et les articles publiés donnent le détail des méthodes d'amplification et de séquençage.

Les gènes étudiés sont ceux pour lesquels des séquences étaient déjà disponibles sur GenBank, soit les deux gènes mitochondriaux COI et 16S et les gènes nucléaires 28S et 18S (ce dernier amplifié seulement pour les gastéropodes stygobies). Contrairement à d'autres groupes pour lesquels la qualité des séquences disponibles dans GenBank a été largement critiquée (ex. Harris 2003 ; Pennisi 2008 ; Buhay 2009 ; Tixier *et al.* 2011), les séquences déposées pour les naïades européennes et les gastéropodes stygobies ne posent pas de problèmes de détermination, ni de pseudogènes (à l'exception de quelques séquences d'ADN mitochondrial mâle non spécifiées comme telles). Une synthèse des séquences utilisées est présentée en ANNEXE II.

I.4.5 Mise en œuvre opérationnelle

Les premières analyses moléculaires ont été réalisées au sein de l'UMR 7138. J'y ai appris les techniques de laboratoire couramment mises en œuvre pour l'extraction, l'amplification PCR et le traitement des séquences. Par la suite, dans une optique de taxonomie opérationnelle qui puisse être facilement mise en œuvre par les bureaux d'études, il a été fait le choix de sous-traiter les extractions, amplifications et séquençage à des entreprises privées, à savoir Genoscreen à Lille et Eurofins en Allemagne. Ce choix, plus onéreux, a été guidé par l'économie de temps réalisée : il est rapidement apparu lors du début du travail de thèse que la rentabilité était meilleure, tant du point de vue des résultats que du point de vue financier, en déléguant les manipulations à des sociétés privées qu'en réalisant moi-même les extractions et amplifications au sein du laboratoire d'accueil. Si les tarifs des sociétés privées peuvent paraître exorbitants pour le chercheur, habitué à un fonctionnement qui fait intervenir une bonne part de fonds publics, le modèle économique développé ici est tout à fait viable pour un bureau d'étude. L'expérience a montré que les clients des bureaux d'études accueillent favorablement l'inclusion d'analyses moléculaires dans les devis d'expertises, et la sous-traitance des manipulations occasionne un surcoût qui reste négligeable en comparaison du coût du travail de terrain (facturé entre 550 et 650 € par jour) et des temps d'analyse et de rédaction (> 650 € par jour). Qui plus est, dans l'optique de la mise en place de méthodes de taxonomie opérationnelle, il était important de tester la faisabilité d'utiliser les outils moléculaires dans le cadre du travail quotidien des bureaux d'études, indépendamment du travail de thèse qui fait intervenir la collaboration avec un laboratoire public. Enfin, un calcul de rentabilité de l'acquisition d'équipements idoïnes, même en se limitant aux extractions, a montré que la sous-traitance était économiquement plus intéressante.

Le séquençage des mollusques souterrain s'est montré particulièrement difficile pour des raisons qui restent mal comprises (présence d'inhibiteurs ? De Polysaccharides ? Influence des ultra-violets sur des organismes dépigmentés ? Age des spécimens analysés ?). Le chapitre qui suit se focalise donc sur les résultats obtenus sur les naïades. La détermination des bivalves sur le terrain est difficile (Shea *et al.* 2011), surtout lorsqu'il s'agit d'espèces à enjeux de conservation qui doivent être déterminées vivantes, c'est-à-dire sans avoir accès aux critères internes tels que la dent, qui est primordiale pour la détermination des Unionidae. Les analyses moléculaires, dans le contexte scientifique de barcoding sensu stricto, c'est-à-dire

L'utilisation du gène COI pour l'identification moléculaire de spécimens indéterminés, fournissent un outil de premier ordre pour pallier à cette difficulté.

Ce travail s'inscrivant dans une perspective de taxonomie opérationnelle destinée au travail de bureau d'études, je présente ici les méthodes mises en œuvre et les résultats obtenus sur l'ensemble de l'échantillonnage réalisé. Les questions posées sont d'ordre pratique : comment appliquer les analyses moléculaires à la détermination des taxons sur le terrain lors des expertises des bureaux d'études ? Quels sont les coûts ? Quels sont les écueils et les succès de la démarche ? Comment optimiser la démarche ?

1.4.5.1 Prestataires

Deux prestataires ont été sollicités pour réaliser l'extraction, l'amplification et le séquençage. Pour les besoins du bureau d'étude, qui ne dispose pas de laboratoire, il était indispensable que les prestataires puissent prendre en charge l'extraction et l'amplification. Cette demande étant nouvelle pour les prestataires, ils ont dû produire un devis adapté. Seuls Genoscreen à Lille et Eurofins en Allemagne ont répondu favorablement à cette sollicitation.

Leurs prestations diffèrent par la méthode (voir Prié & Puillandre 2013) et les tarifs : pour Genoscreen, l'extraction est facturée 6,50 €, l'amplification 1,50 € et le séquençage double sens (1 seul gène) 18,00 €, soit un total de 60,50 € par échantillon pour les 4 gènes COI, 16S, 28S et ITS. Pour Eurofins, dont les tarifs incluent l'envoi des échantillons par colis sécurisé, chaque échantillon coûte entre 60,00 € et 75,00 € pour les quatre gènes, selon le nombre d'échantillons envoyés (75,00 € pour 1 à 7 échantillons ; 65,00 € pour 8 à 15 échantillons ; 60,00 € pour 16 à 24 échantillons).

1.4.5.2 Taux de succès des deux prestataires

Les résultats présentés ici concernent uniquement les manipulations, mais pas les résultats scientifiques, qui sont présentés par ailleurs sous la forme d'articles publiés ou en préparation.

Echantillonnage et séquences obtenues

Au total, 573 échantillons de bivalves ont été collectés entre septembre 2009 et mai 2013 ; dont 542 spécimens euthanasiés, qui sont conservés en collection au MNHN. Des extractions ont été effectuées pour 427 échantillons ; de l'ADN a pu être amplifié pour 411 échantillons.

Nous avons choisi d'amplifier deux gènes mitochondriaux, le COI et le 16S, qui sont les plus utilisés par les taxonomistes mais présentent l'inconvénient de ne retracer que l'histoire des femelles ; et deux gènes nucléaires, le 28S et les ITS (ITS1, 5,8S et ITS2) de manière à disposer d'un marqueur indépendant, qui permet en outre de retracer une histoire commune aux mâles et aux femelles. Dans le cadre de ce travail, 411 spécimens ont fourni 1181 séquences exploitables. Dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratory of Marine Community Ecology and Evolution à Porto, 22 spécimens d'*Anodonta* spp. (bassin de la Seine) et 55 spécimens de *Potomida littoralis* (Vienne et Adour) supplémentaires sont en cours de séquençage par l'Université de Porto.

Taux de succès quantitatifs en fonction des gènes analysés

Dans une optique d'optimisation de la taxonomie opérationnelle, j'ai cherché quel gène était optimal pour reconnaître les espèces, en fonction de leurs succès à l'amplification (**Tableau 5**) et de leur pertinence pour répondre à la question posée. Le COI, utilisé traditionnellement en barcoding (ex. Hebert *et al.* 2003a, b ; Lefébure *et al.* 2006b ; Boyer *et al.* 2011), est moins pertinent pour les bivalves du genre *Unio* en raison du pourcentage important d'amplifications d'ADN mâle (voir § II.1.5) : sur les 320 spécimens d'*Unio*, l'amplification a fourni de l'ADN mâle dans 20% des cas. Le gène 28S est le plus facile à amplifier, mais c'est aussi le moins variable, ce qui le rend inutile dans le contexte de taxonomie moléculaire opérationnelle aux niveaux péri- et intra-spécifiques. Les ITS ont été difficiles à amplifier et à aligner et n'ont pas été opérationnels dans le cadre de cette étude, contrairement à ce que suggèrent (Källersjö *et al.* 2005). Le gène le plus pertinent pour une taxonomie opérationnelle est le 16S qui est facile à amplifier, ne pose pas de problème d'amplification d'ADN mitochondrial mâle et est suffisamment variable pour distinguer les espèces et sous-espèces (**ARTICLE 6**).

Tableau 5 : résultat des amplifications et séquençages des gènes étudiés pour l'ensemble des échantillons traités.

	COI	16S	28S	ITS
Tentative d'amplification	390	404	313	284
Pas d'amplification	66	23	15	51
Séquence double	19	8	4	0
Séquence obtenue	367	373	294	233
Séquence partielle	0	0	0	20
Séquence mDNA	62	0	-	-
Séquence bizarre	0	4	0	?
Séquence exploitable	305	369	294	213
Taux de succès	78 %	91 %	94 %	75 %

Taux de succès en fonction de la méthode de prélèvement

La méthode de prélèvement la plus souvent utilisée est l'ablation d'un morceau du pied. Sur les 10 échantillons de cténidie amplifiés, la proportion d'ADN mâle et de séquences à doubles pics (interprétées comme la co-amplification des allèles mâles et femelle) est similaire à celle obtenue à partir du pied (respectivement 20% et 10%). Les quelques échantillons de périostracum prélevés n'ont pas fourni suffisamment d'ADN pour être amplifiés. Le prélèvement à l'aide d'écouvillons s'est révélé très médiocre : plus de 80% des prélèvements n'ont pas pu être amplifiés par Genoscreen.

Taux de succès en fonction du prestataire

Eurofins propose des tarifs notablement plus élevés que Genoscreen, en particulier pour les petits lots, qui forment l'essentiel dans le cadre de bureaux d'études : les prélèvements sont limités en raison de la sensibilité des espèces, du faible nombre de taxons étudiés ici, du peu de temps alloué aux études et donc de la faible quantité d'échantillons récoltés, et des exigences économiques qui nécessitent de réduire les coûts au minimum. Les réponses sont attendues dans des délais très brefs (de l'ordre de quelques mois) et il est donc difficile de regrouper les échantillons avant l'envoi aux sociétés de service. En moyenne, les envois se composent de moins d'une dizaine d'échantillons pour chaque étude.

De manière à optimiser les frais liés à la sous-traitance, j'ai évalué les résultats obtenus par chacune des sociétés (Tableau 6). Pratiquant des tarifs plus élevés, les performances d'Eurofins sont significativement supérieures à celles de Genoscreen. Ceci est dû en partie à l'acharnement des techniciens, qui n'hésitent pas à redessiner des primers en cas d'échec, ainsi qu'à la méthode employée pour l'amplification : il est intéressant de constater qu'Eurofins a très rarement amplifié de l'ADN mitochondrial mâle. Le protocole utilisé par Eurofins est donc plus opérationnel dans une optique de barcoding.

Tableau 6 : résultats obtenus par Eurofins et Genoscreen pour chaque gène analysés

	Eurofins				Genoscreen			
	COI	16S	28S	ITS	COI	16S	28S	ITS
Nb de séquences demandées	165	152	154	151	214	219	154	133
Nb de séquences exploitables obtenues	148	142	145	135	147	203	145	78
Nb de COI mâle	1				18			
Taux de succès par gène	89 %	93 %	94 %	89 %	60 %	93 %	94 %	59 %
Taux de succès global		91 %				77 %		

La sous-traitance des manipulations pose le problème du suivi des échantillons et de la gestion des contaminations : le bureau d'étude n'a plus aucun suivi des échantillons une fois qu'ils ont été postés et doit faire entièrement confiance au professionnalisme des équipes sous-traitantes. Au cours de cette étude, 10 spécimens ont été envoyés deux fois de suite aux sous-traitants. A chaque fois, les séquences retournées étaient homologues (les différences résidant dans la taille des fragments obtenus).

Taux de succès en fonction des espèces

Si les résultats varient en fonction des prestataires, les différences sont encore plus importantes en fonction des espèces (Tableau 7). Les chances de succès pour l'analyse du gène COI sont faibles pour *U. crassus* et *U. pictorum*, en partie parce que le pourcentage d'amplification d'ADN mitochondrial mâle est très élevé (en moyenne 18% des séquences obtenues). Le gène 16S est celui qui donne les meilleurs résultats, sauf chez *P. littoralis* pour qui seulement 70% des échantillons ont été amplifiés avec succès. Le 28S a pu être amplifié dans 100% des cas chez la plupart des espèces, mais sur les six spécimens de *M. auricularia* analysés une seule séquence a été obtenue. Globalement difficiles à amplifier, les ITS ont fourni des résultats très variables selon les espèces.

Tableau 7 : pourcentage de succès à l'amplification en fonction des taxons. Les valeurs les plus faibles sont encadrées.

	COI	16S	28S	ITS
<i>M. auricularia</i>	83	100	17	67
<i>M. margaritifera</i>	100	100	100	100
<i>P. littoralis</i>	93	71	86	83
<i>U. c. courtillieri</i>	65	95	91	52
<i>U. c. crassus</i>	76	98	92	71
<i>U. m. mancus</i>	86	97	100	84
<i>U. m. requienii</i>	84	96	100	93
<i>U. m. turtonii</i>	89	100	100	100
<i>U. pictorum</i>	76	98	100	63
<i>U. tumidus</i>	96	100	100	100

I.4.6 Plan de la thèse

Après avoir présenté les généralités concernant l'application des noms, les mécanismes de la conservation, leurs biais, et les deux modèles étudiés dans la partie I, la partie II est consacrée aux résultats obtenus pour les naïades de France, avec (i) une approche moléculaire visant à tester les hypothèses évolutives implicitement induites par l'état de l'art de la taxonomie hérité des travaux de Haas (1969) et de Falkner *et al.* (2002) ; (ii) une approche morphométrique à la recherche de critères permettant de distinguer sur le terrain les différentes lignées évolutives observées ; (iii) le test de l'hypothèse d'une structuration spatiale des unités évolutives selon le principe de l'insularité continentale. Je chercherai ici à rejeter l'hypothèse nulle selon laquelle la dispersion des différentes espèces de naïades serait indépendante des barrières géographiques ; leur répartition suivrait alors essentiellement les variables environnementales et la modélisation de la distribution géographique de ces variables présenterait une image fidèle de la répartition effective des espèces.

Dans la partie III, les gastéropodes stygobies du Nord-Montpelliérain sont traités selon une séquence similaire avec (i) une présentation des observations préliminaires sur la structuration des associations faunistiques en fonction des zones hydrologiques élémentaires, (ii) une approche morphométrique et moléculaire qui permet d'affiner ces résultats préliminaires et (iii) un test de l'hypothèse nulle selon laquelle les variables environnementales peuvent influencer sur la dispersion des taxons (**Tableau 8**).

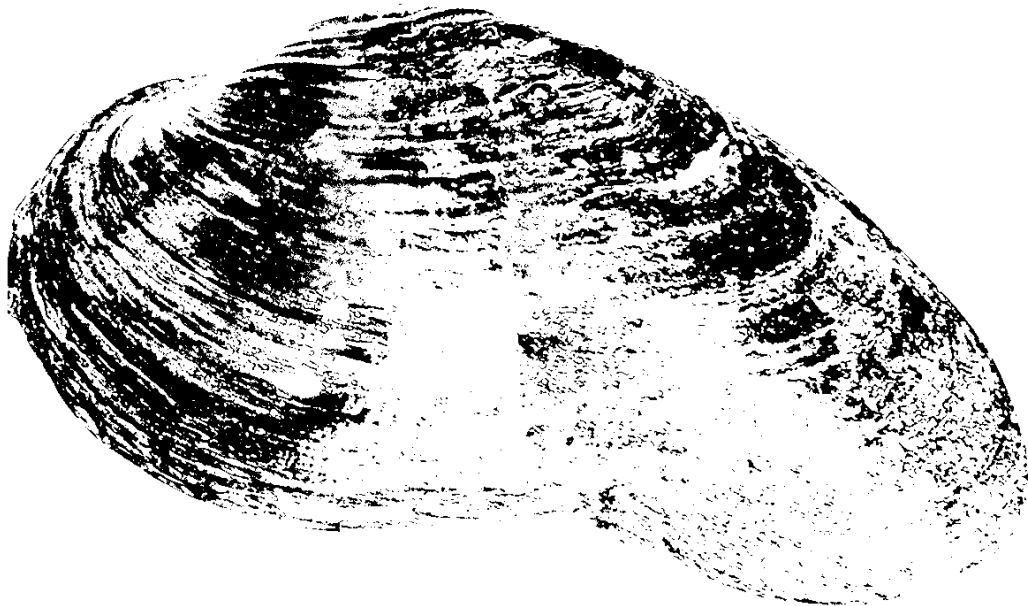
Les parties II et III se composent de plusieurs articles publiés, soumis ou en préparation. La discussion générale (partie IV) reprend les résultats obtenus pour ces deux modèles et reprends les thématiques transversales d'insularité continentale, de taxonomie opérationnelle et de conservation.

Tableau 8 : récapitulatif des hypothèses testées par ce travail

Hypothèses	Taxons à large répartition : les naïades de France	Taxons à aire de répartition restreinte : les gastéropodes stygobies du nord-montpelliérain
Les barrières géographiques sont à l'origine de la spéciation, les taxons peuvent être définis spatialement indépendamment des variables environnementales	<p>ARTICLE 3 La répartition des unités évolutives au sein d'<i>U. mancus</i> semble liée à la structuration de grands ensembles hydrologiques</p> <p>ARTICLES 4 à 6 La répartition des unités évolutives semble indépendante des barrières géographiques</p>	<p>ARTICLE 8 La répartition des unités évolutives est corrélée à la structuration des hydrosystèmes</p>
Les taxons sont indépendants des barrières géographiques, leur répartition suit des variables environnementales	<p>ARTICLE 7 La modélisation d'habitat indique que les naïades occupent la totalité de la niche disponible, indépendamment des barrières géographiques</p>	<p>ARTICLE 9 Les variables environnementales ne sont pas corrélées à la répartition des espèces</p>

Les conclusions pratiques attendues sont (i) la clarification de la taxonomie à l'aide d'outils moléculaires, (ii) la spatialisation des enjeux de conservation, quelles échelles doit-on considérer pour définir les unités de conservation (iii) la production d'outils pour une taxonomie opérationnelle (à l'attention notamment des bureaux d'études)

Partie II : naïades



Les bivalves dulçaquicoles figurent parmi les espèces les plus menacées mondialement (Lydeard *et al.* 2004). Que l'on se place du point de vue du taxonomiste ou de celui de la conservation, la question des unités biologiques à considérer en compte est cruciale. Ne pouvant me placer à l'échelle de l'aire de répartition globale des taxons (trop vaste), je me suis limité à l'étude des naïades de France, en testant la pertinence d'utiliser l'échelle des bassins-versants de fleuves comme unité de gestion.

La détermination des différentes espèces est difficile sur la base de la coquille uniquement, les outils moléculaires ont donc été utilisés et ont permis de clarifier leur taxonomie, et dans certains cas seulement de distinguer des lignées évolutives liées aux bassins-versants (chapitre II.1). J'ai cherché dans un second temps des critères morphologiques permettant de soutenir les hypothèses issues de la phylogénie, mais la morphologie des coquilles se heurte à des problèmes méthodologiques et est globalement trop variable pour être discriminante (chapitre II.2). La modélisation de leur habitat semble indiquer que les aires de répartition des espèces sont en revanche contraintes par l'environnement (chapitre II.3).

II.1 PHYLOGEOGRAPHIE ET DIVERSITE GENETIQUE

II.1.1 Barcoding chez *U. mancus* et *U. pictorum*

Une première analyse basée sur le barcoding (analyse du gène COI uniquement) a été réalisée sur les populations d'*U. mancus* et *U. pictorum* en France. Les résultats révèlent une structuration génétique chez *U. mancus*, qui permet de retenir trois sous-espèces, *U. m. mancus*, *U. m. requienii* et *U. m. turtonii*, dont la répartition couvre les grands ensembles hydrographiques, respectivement de la façade atlantique, du Rhône et de la Seine, et des fleuves côtiers méditerranéens à l'est du Rhône ainsi que de la Corse (Fig. 23). En revanche, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence de lignées évolutives distinctes qui correspondraient aux sous-espèces *U. m. moquinianus* et *U. m. aleronii*. Un doute subsiste quand aux topotypes du Lac du Bourget, qui ne correspondent pas morphologiquement au matériel type d'*U. m. bourgeticus*. Les topotypes d'*U. m. brindosianus* se regroupent dans le clade d'*U. pictorum*. Pour cette dernière, aucune structuration génétique ne vient soutenir l'existence des quatre sous-espèces valides actuellement. Néanmoins, nous n'avons pas pu collecter de topotypes correspondant à *U. p. platyrinchoideus* ni à *U. p. deshayesii*. Les individus du bassin-versant du Rhône ne présentent pas de particularité génétique, et ne correspondent donc pas à une entité évolutive distincte permettant de justifier le statut de sous-espèce d'*U. p. rostratus*.

Cet article repose sur un seul gène. Il n'inclue pas de caractères indépendants comme la morphométrie. Il montre toutefois que la variabilité morphométrique observée, qui est importante entre les stations, n'est pas corrélée à une divergence génétique. Les résultats obtenus, même si ils posent la question de la validité des topotypes collectés pour tester les hypothèses taxonomiques, tendent à indiquer que l' α -diversité actuelle est surévaluée.

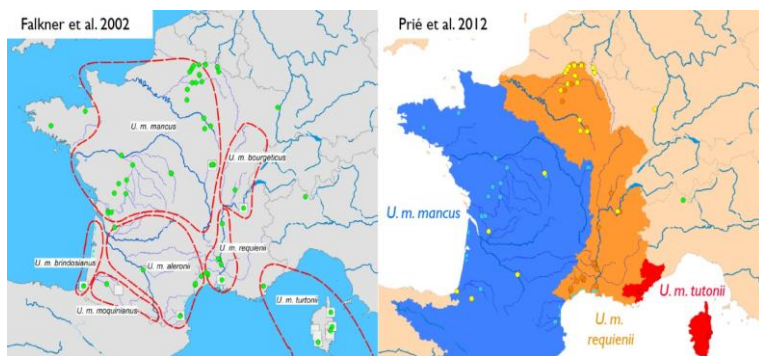


Figure 23 : résumé des résultats de l'article I. A droite l'état de l'art d'après Falkner *et al.* (2002), à gauche la cartographie des sous-espèces d'*U. mancus* telle que proposée par Prié *et al.* 2012. Le nombre d'unités taxonomiques valides est réduit de moitié pour cette dernière ; il est divisé par quatre pour *U. pictorum* (aucune des sous-espèces validées par Falkner *et al.* (2002) n'est soutenue par l'analyse du gène COI).

ARTICLE 3

Prié, V., Puillandre, N. & Bouchet, P. 2012. Bad taxonomy can kill: molecular reevaluation of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Unionidae) and its accepted subspecies. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 405: 18.

Bad taxonomy can kill: molecular reevaluation of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Unionidae) and its accepted subspecies

V. Prie^{(1,2),*}, N. Puillandre⁽¹⁾, P. Bouchet⁽¹⁾

Received October 22, 2011

Revised April 27, 2012

Accepted May 11, 2012

ABSTRACT

Key-words:

COI gene,
conservation genetics,
freshwater mussel,
molecular systematics,
species delimitation

The conservation status of European unionid species rests on the scientific knowledge of the 1980s, before the current revival of taxonomic reappraisals based on molecular characters. The taxonomic status of *Unio mancus* Lamarck, 1819, superficially similar to *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) and often synonymized with it, is re-evaluated based on a random sample of major French drainages and a systematic sample of historical type localities. We confirm the validity of *U. mancus* as a distinct species occurring in France and Spain, where it is structured into three geographical units here ranked as subspecies: *U. m. mancus* [Atlantic drainages, eastern Pyrenees, Spanish Mediterranean drainages], *U. m. turtonii* Payraudeau, 1826 [coastal drainages East of the Rhône and Corsica] and *U. m. requienii* Michaud, 1831 [Seine, Saône-Rhône, and coastal drainages West of the Rhône]. Many populations of *Unio mancus* have been extirpated during the 20th century and the remaining populations continue to be under pressure; *U. mancus* satisfies the criteria to be listed as “Endangered” in the IUCN Red List.

RÉSUMÉ

Les risques d'une mauvaise taxonomie : réévaluation moléculaire d'*Unio mancus* Lamarck, 1819 (Bivalvia : Unionidae) et de ses sous-espèces

Mots-clés :

gène COI,
génétique de la conservation,
moules d'eau douce,
systématique moléculaire,
délimitation d'espèces

Le statut de conservation des espèces d'unionidés européennes repose sur les connaissances scientifiques des années 1980, avant le renouveau des ré-évaluations taxonomiques basées sur des caractères moléculaires. Le statut taxonomique de la Mulette méridionale *Unio mancus* Lamarck, 1819, superficiellement semblable à la Mulette des peintres *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) et souvent mise en synonymie avec elle, est ici réévalué sur la base d'un échantillonnage à l'aveugle des grands bassins versants français et d'un échantillonnage ciblé des localités-types historiques. Nous confirmons la validité d'*Unio mancus* comme espèce distincte, présente en France et en Espagne, où elle est structurée en trois unités géographiques ici traitées comme sous-espèces : *U. m. mancus* [bassins versants atlantiques, est des Pyrénées,

(1) Muséum national d'Histoire naturelle, Département Systématique et Évolution, USM 603/UMR 7138 “Systématique, Adaptation, Évolution”, Équipe “Exploration de la Biodiversité”, Case Postale 51, 55 Rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France

(2) BIOTOPE, Service Recherche & Développement, BP 58, 22 bd Maréchal Foch, 34140 Mèze, France

bassins versants méditerranéens espagnols] *U. m. turtonii* Payraudeau, 1826 [bassins versants des fleuves côtiers à l'est du Rhône et de Corse] et *U. m. requienii* Michaud, 1831 [Seine, Saône-Rhône, et fleuves côtiers à l'ouest du Rhône]. De nombreuses populations d'*Unio mancus* ont été éradiquées dans le courant du 20^e siècle et beaucoup de populations restantes restent menacées ; l'espèce répond aux critères « En Danger » pour la Liste Rouge de l'UICN.

INTRODUCTION

Freshwater mussels combine several life history traits (longevity, filter feeding, larvae parasitic on the gills of fishes) that make them particularly vulnerable to loss of habitat quality. Unionidae have the dubious privilege of being among the most threatened freshwater invertebrates (Lydeard *et al.*, 2004), with 20% of North American species already listed as Extinct or Possibly Extinct (Master *et al.*, 2000), and a number of European species protected under national or European regulations. Because legislative texts protect species through names, it is important that names reflect appropriate evolutionary and/or conservation units. However, the taxonomy of European unionids is still unstabilized, especially in southern Europe, and the current listings on legislative texts – which reflect the scientific knowledge of the 1980s – have not kept pace with advances in taxonomical knowledge.

The taxonomy of European unionids is plagued with a plethora of names. Based on a typological approach to within- and between-population phenotypic diversity, hundreds of nominal species have been described, especially as a result of the excesses of the 19th century French « Nouvelle École » (see Bouchet, 2002). There is an important body of classical and modern literature that documents shell plasticity in unionoids (e.g., Ortmann, 1920; Agrell, 1948; Nagel, 1992; Watters, 1994; McMurray *et al.*, 1999; Zieritz and Aldridge, 2009; Zieritz *et al.*, 2010) and, based on phenotypic resemblances, these 19th century names have ended up in synonymy (see, among others, Haas, 1969). Molecular techniques are now allowing a fresh evaluation of these nominal species, confirming in many cases morphology-based synonymies (Araujo *et al.*, 2005; Araujo *et al.*, 2009b), but sometimes leading to the revalidation of some abusively synonymized species (Araujo *et al.*, 2009a, 2009b; Reis and Araujo, 2009; Khalloufi *et al.*, 2011). Conservation programs now largely advocate the use of genetic approaches to evaluate the validity of the evolutionary and/or conservation units being managed (Schonewald-Cox *et al.*, 1983; Machordom *et al.*, 2003; Geist and Kuehn, 2005).

“Bad taxonomy can kill” (May, 1990; Mace, 2004). Given the subjective basis of the taxonomic validity of many nominal species, it is not impossible that important conservation units remain unrecognized or buried in the “graveyard of synonymy”. Clarifying the taxonomic status of potentially endangered taxa is thus a major concern. Among the unionoids of French hydrographic basins, the taxonomic status of *Unio mancus* Lamarck, 1819 has been controversial in the recent literature. Based on shell characters, Haas (1969) considered *U. mancus* as one of the subspecies of *U. elongatulus* C. Pfeiffer, 1825 (despite the nomenclatural priority of *mancus* over *elongatulus*). Nagel and Badino (2001), based on enzymatic studies, treated *U. mancus* as a subspecies of *U. pictorum* Linnaeus, 1758. In the taxonomic authority list of French non-marine molluscs, Falkner *et al.* (2002) listed *U. mancus* as a valid species with seven subspecies, largely inspired from Haas' (1969) subspecies of *U. elongatulus*: *U. m. mancus* [Seine, Loire, Charente basins, coastal rivers of Normandy], *U. m. aleronii* Companyo and Massot, 1845 [eastern Pyrenees and Garonne basin], *U. m. bourgeticus* Bourguignat in Locard, 1882 [Saône and Ain drainages, Lake Bourget], *U. m. brindosianus* de Folin and Berillon, 1874 [coastal lakes of the Landes], *U. m. moquinianus* Dupuy, 1843 [piedmont of central and western Pyrenees], *U. m. requienii* Michaud, 1831 [Rhône basin downstream of Lyon], and *U. m. turtonii* Payraudeau, 1826 [Corsica], suggesting that their geographical segregation implied underlying genetic isolation. The status of *U. mancus* as a valid species was confirmed by Araujo *et al.* (2005) based on molecular and ecological data on Spanish

* Corresponding author: vprie@biotope.fr

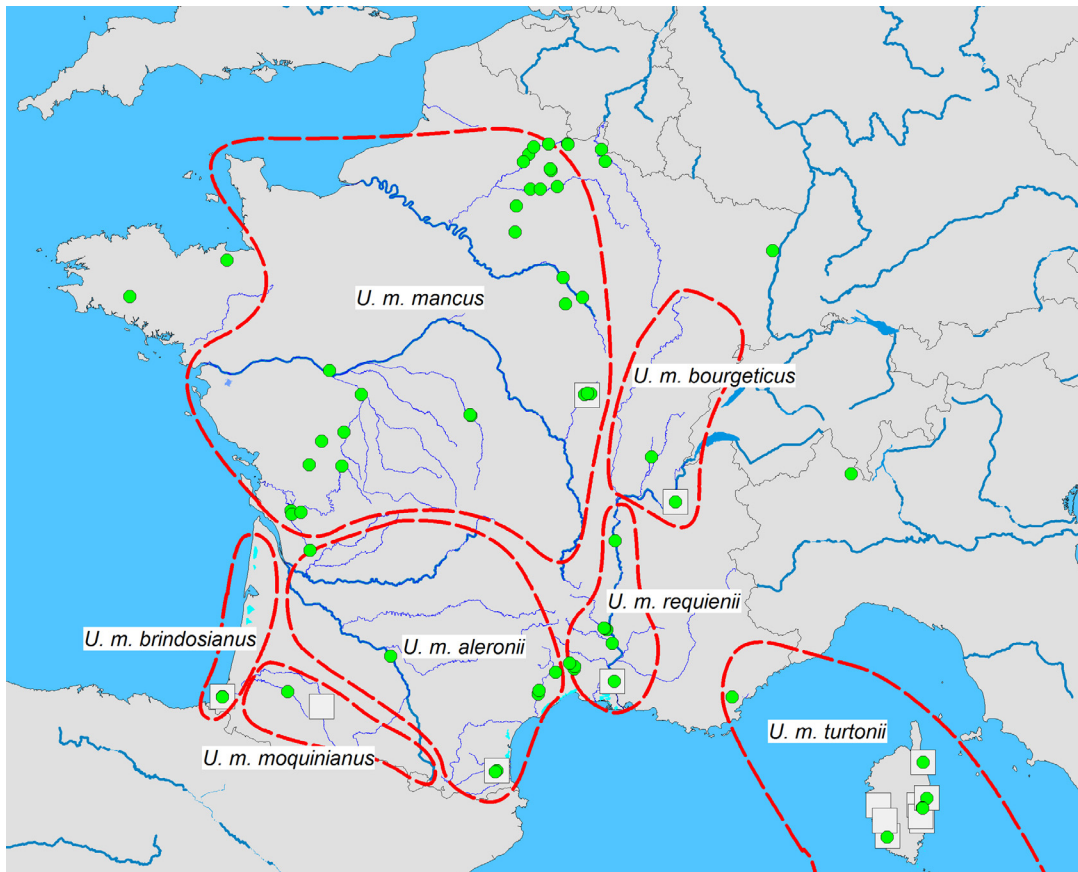


Figure 1

Distribution of *Unio mancus* subspecies in France according to Falkner et al. (2002) (red dotted lines). Type localities are indicated by grey squares. Localities sampled for this study are represented by green dots.

populations. Except for *U. aleronii* (synonymized with *U. mancus* by Araujo et al., 2009c), the status of the subspecies recognized by Falkner et al. (2002) has not been further evaluated. Because of the considerable phenotypic variation of the shell in unionids, the application of names beyond their type locality or, at least, beyond the hydrographic basin of their type locality, is problematic. In consequence, and through COI sequences obtained from topotypical populations, the purpose of the present study is (1) to re-evaluate the taxonomic status of *U. mancus* and compare it specifically with *U. pictorum*, and (2) to evaluate the taxonomic status of the different nominal subspecies of *U. mancus*.

MATERIAL AND METHODS

> MATERIAL STUDIED

The main drainage systems of France (Rhine River excepted) were sampled, with special consideration for the type localities of the accepted subspecies (Figure 1, Table I). Sampling was successful for type localities of *U. m. mancus* Lamarck, 1819, *U. m. aleronii* Companyo and Massot, 1845, *U. m. bourgeticus* Bourguignat, 1882, *U. m. brindosianus* de Folin and Bérillon, 1874, *U. m. requienii* Michaud, 1831 and *U. m. turtonii* Payraudeau, 1826. *U. m. moquinianus* Dupuy, 1843, seems to have been extirpated from its type locality and we sampled nearby localities belonging to the same drainage. In addition, specimens from Lake Maggiore in Italy were included in the dataset. A total of 151 specimens were sampled in 38 localities (Figure 1, Table I).

Table 1

Samples localities, MNHN numbers and GenBank accession numbers. All sequences have been produced for this paper, except sequences from Spain and Poland. MNHN voucher numbers begin with "MNHN IM-2009". *: type localities.

Maritime Facade	Major drainage system	River	Species	Clade	Haplotype	Voucher n°	Genebank accession n°	
Atlantic	Adour	Loutz	<i>U. m. mancus</i>	1c	1	12598	JX046569	
			<i>U. m. mancus</i>	1c	1	12599	JX046570	
		Lake Brindos *	<i>U. pictorum</i>	2	18	17835	JX046654	
			<i>U. pictorum</i>	2	18	17836	JX046655	
			<i>U. pictorum</i>	2	18	17837	JX046656	
			<i>U. pictorum</i>	2	18	17838	JX046657	
			<i>U. pictorum</i>	2	18	17839	JX046658	
		Gave de Pau	<i>U. pictorum</i>	2	17	21214	JX046659	
			<i>U. pictorum</i>	2	19	21215	JX046660	
			<i>U. pictorum</i>	2	17	21216	JX046661	
		Charente	Belle	<i>U. m. mancus</i>	1c	1	12710	JX046592
				<i>U. m. mancus</i>	1c	1	12711	JX046593
	<i>U. m. mancus</i>			1c	1	12713	JX046594	
	<i>U. m. mancus</i>			1c	1	12714	JX046595	
	Né		<i>U. m. mancus</i>	1c	1	12715	JX046596	
			<i>U. m. mancus</i>	1c	6	12716	JX046597	
			<i>U. m. mancus</i>	1c	6	12717	JX046598	
	Seugne		<i>U. m. mancus</i>	1c	3	12602	JX046571	
		<i>U. m. mancus</i>	1c	1	12604	JX046572		
	Dordogne	Lary	<i>U. pictorum</i>	2	17	12588	JX046566	
	Loire	Authion	<i>U. pictorum</i>	3	17	12589	JX046567	
			<i>U. m. mancus</i>	1a	6	21274	JX046678	
			<i>U. m. mancus</i>	1a	1	21275	JX046679	
			<i>U. m. mancus</i>	1a	1	21276	JX046680	
			<i>U. m. mancus</i>	1a	6	21277	JX046681	
			<i>U. m. mancus</i>	1a	1	21278	JX046682	
			<i>U. m. mancus</i>	1a	6	21279	JX046683	
			<i>U. m. mancus</i>	1a	6	21280	JX046684	
			<i>U. m. mancus</i>	1a	6	21281	JX046685	
			<i>U. m. mancus</i>	1a	6	21282	JX046686	
			<i>U. m. mancus</i>	1a	1	21283	JX046687	
			Boivre	<i>U. m. mancus</i>	1c	6	12591	JX046568
			Drée*	<i>U. m. mancus</i>	1c	6	21267	JX046675
				<i>U. m. mancus</i>	1c	6	21268	JX046676
		<i>U. m. mancus</i>		1c	6	21269	JX046677	
		Cher	<i>U. m. mancus</i>	1c	2	21293	JX046691	
			<i>U. m. mancus</i>	1c	4	21294	JX046692	
			<i>U. m. mancus</i>	1c	6	21295	JX046693	
			<i>U. m. mancus</i>	1c	6	21296	JX046694	
			<i>U. pictorum</i>	2	17	21297	JX046695	
			<i>U. m. mancus</i>	1c	6	21298	JX046696	
			<i>U. m. mancus</i>	1c	1	21299	JX046697	
<i>U. m. mancus</i>			1c	2	21300	JX046698		
<i>U. pictorum</i>			2	17	21301	JX046699		
Vonne		<i>U. m. mancus</i>	1c	1	12666	JX046575		
		<i>U. m. mancus</i>	1c	1	12667	JX046576		
		<i>U. m. mancus</i>	1c	6	12668	JX046577		
Aër		Ellé	<i>U. m. mancus</i>	1c	6	17787	JX046632	
			<i>U. m. mancus</i>	1c	6	17788	JX046633	

Table 1
Continued.

Maritime Facade	Major drainage system	River	Species	Clade	Haplotype	Voucher n°	Genebank accession n°		
Atlantic via Manche	Blez Jean	Beaufort	<i>U. m. mancus</i>	1a	5	21302	JX046700		
			<i>U. m. mancus</i>	1a	5	21303	JX046701		
			<i>U. m. mancus</i>	1a	5	21304	JX046702		
			<i>U. m. mancus</i>	1a	5	21305	JX046703		
			<i>U. m. mancus</i>	1a	5	21306	JX046704		
			<i>U. m. mancus</i>	1a	5	21307	JX046705		
	Atlantic via Manche	Aisne		<i>U. pictorum</i>	2	17	17764	JX046627	
				<i>U. pictorum</i>	2	17	17798	JX046634	
				<i>U. pictorum</i>	2	17	17799	JX046635	
				<i>U. pictorum</i>	2	17	17801	JX046636	
				<i>U. pictorum</i>	2	17	17802	JX046637	
		Armance		<i>U. pictorum</i>	0	19	21250	JX046674	
				<i>U. pictorum</i>	1	23	21285	JX046688	
		Eure		<i>U. pictorum</i>	2	23	21286	JX046689	
				<i>U. pictorum</i>	2	17	21287	JX046690	
		Oise		<i>U. pictorum</i>	2	21	12688	JX046581	
		Seine	Ourcq		<i>U. m. requienii</i>	1b	13	21218	JX046662
					<i>U. m. requienii</i>	1b	13	21222	JX046663
					<i>U. m. requienii</i>	1b	13	21224	JX046664
					<i>U. m. requienii</i>	1b	13	21228	JX046665
					<i>U. m. requienii</i>	1b	13	21229	JX046666
					<i>U. m. requienii</i>	1b	13	21231	JX046667
					<i>U. m. requienii</i>	1b	13	21233	JX046668
					<i>U. pictorum</i>		23	21234	JX046669
					<i>U. m. requienii</i>	1b	13	21235	JX046670
					<i>U. pictorum</i>	2	23	21236	JX046671
			Petit Morin		<i>U. m. requienii</i>		11	17803	JX046638
					<i>U. m. requienii</i>	1b	13	17810	JX046643
					<i>U. m. requienii</i>	1b	13	17812	JX046644
					<i>U. m. requienii</i>		12	17813	JX046645
					<i>U. m. requienii</i>	1b	13	17814	JX046646
			Seine		<i>U. m. requienii</i>	1b	13	21242	JX046672
<i>U. m. requienii</i>					1b	13	21245	JX046673	
<i>U. pictorum</i>					2	21	12695	JX046582	
<i>U. pictorum</i>		2			17	12696	JX046583		
Somme		Somme Canal	<i>U. pictorum</i>	2	17	17771	JX046628		
			<i>U. pictorum</i>	2	21	17772	JX046629		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12571	JX046556		
Mediterranean	Argens	Argens	<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12571	JX046556		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	10	12579	JX046563		
	Basse	Basse*	<i>U. m. mancus</i>	1c	6	17815	JX046647		
			<i>U. m. mancus</i>	1c	6	17816	JX046648		
			<i>U. m. mancus</i>	1c	6	17817	JX046649		
			<i>U. m. mancus</i>	1c	6	17818	JX046650		
			<i>U. m. mancus</i>	1c	6	17819	JX046651		
			<i>U. m. mancus</i>	1c	6	17820	JX046652		
			<i>U. m. mancus</i>	1c	6	17821	JX046653		
	Hérault	Hérault	<i>U. m. requienii</i>	1b	14	12569	JX046554		
			<i>U. m. requienii</i>	1b	13	12572	JX046557		
	Rhône	Lamalou		<i>U. m. requienii</i>	1b	14	12570	JX046555	
				<i>U. m. requienii</i>	1b	13	12582	JX046565	
		Lake Bourget*		<i>U. m. requienii</i>	1b	13	12701	JX046586	
				<i>U. pictorum</i>	2	17	12703	JX046587	
				<i>U. m. requienii</i>	1b	13	12704	JX046588	
				<i>U. pictorum</i>	2	17	12705	JX046589	
				<i>U. m. requienii</i>	1b	13	12706	JX046590	
				<i>U. m. requienii</i>	1b	15	12708	JX046591	

Table 1
Continued.

Maritime Facade	Major drainage system	River	Species	Clade	Haplotype	Voucher n°	Genebank accession n°		
Mediterranean	Rhône	Cèze	<i>U. m. requienii</i>	1b	13	12581	JX046564		
		Lake Gravière*	<i>U. m. requienii</i>	1b	13	17775	JX046630		
		Rhône	<i>U. m. requienii</i>	1b	13	12605	JX046573		
		Suran	<i>U. m. requienii</i>	1b	13	12699	JX046585		
			<i>U. m. requienii</i>	1b	14	17806	JX046639		
			<i>U. m. requienii</i>	1b	13	17807	JX046640		
			<i>U. m. requienii</i>	1b	14	17808	JX046641		
	Corsica	Fium Orbu*	<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12735	JX046609		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12736	JX046610		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12737	JX046611		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12738	JX046612		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12739	JX046613		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12740	JX046614		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12747	JX046615		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12748	JX046616		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	8	12749	JX046617		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12751	JX046618		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12754	JX046619		
		Golo*	<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	17784	JX046631		
		Taravu*	<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12725	JX046599		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12726	JX046600		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12727	JX046601		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12728	JX046602		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12729	JX046603		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12730	JX046604		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12731	JX046605		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12732	JX046606		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12733	JX046607		
			<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12734	JX046608		
			Taviganu*	<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12758	JX046620	
				<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12759	JX046621	
				<i>U. m. turtonii</i>	1a	9	12760	JX046622	
		<i>U. m. turtonii</i>		1a	9	12761	JX046623		
		<i>U. m. turtonii</i>		1a	9	12762	JX046624		
		<i>U. m. turtonii</i>		1a	9	21815	JX046706		
		<i>U. m. turtonii</i>		1a	9	17750	JX046625		
		Pô	Lake Maggiore	<i>U. elongatulus</i>	3	16	12673	JX046578	
				<i>U. elongatulus</i>	3	16	12674	JX046579	
				<i>U. elongatulus</i>	3	16	12675	JX046580	
		Northern Sea	Meuse	Meuse	<i>U. pictorum</i>	2	22	12573	JX046558
					<i>U. pictorum</i>	2	17	12574	JX046559
					<i>U. pictorum</i>	2	22	12576	JX046561
<i>U. pictorum</i>	2				17	12577	JX046562		
North Sea (Poland)			<i>U. pictorum</i>	2	13	?	AF468684.2		
			<i>U. pictorum</i>	2	14	233	EU548056.1		
			<i>U. pictorum</i>	2	19	253	EU548057.1		

Table 1

Continued.

Maritime Facade	Major drainage system	River	Species	Clade	Haplotype	Voucher n°	Genebank accession n°
Mediterranean (Spain)			<i>U. m. mancus</i>	1c	7	Fw1238-15	AY522847.1
			<i>U. m. mancus</i>	1c	7	Fw1238-18	AY522848.1
			<i>U. m. mancus</i>	1c	7	Fw1487-1	AY522849.1
			<i>U. m. mancus</i>	1c	7	Fw1487-2	AY522850.1
			<i>U. m. mancus</i>	1c	7	Fw1487-3	AY522851.1
			<i>U. m. mancus</i>	1c	7	Fw1487-4	AY522852.1
			<i>U. m. mancus</i>	1c	7	Fw1487-5	AY522853.1
			<i>U. m. mancus</i>	1c	7	Fw1535-N1	AY522854.1
			<i>U. m. mancus</i>	1c	7	Fw1536-N2	AY522855.1
			<i>U. m. mancus</i>	1c	6	Fw1544-N50	AY522856.1
			<i>U. m. mancus</i>	1c	6	Fw1545-N53	AY522857.1
			<i>U. m. mancus</i>	1c	7	Fw1585-N250	AY522858.1
Noth Sea	Meuse	Meuse	<i>U. tumidus</i>			MNHN IM-2009-12575	JX046560
Atlantic	Loire	Vienne	<i>U. crassus</i>			MNHN IM-2009-12564	JX046553
			<i>Margaritifera auricularia</i>			MNHN IM-2009-12611	JX046574

> DNA ANALYSIS

A piece of foot was clipped from living specimens and preserved in 90% ethanol. Soft tissues and shells are kept in the Muséum national d'Histoire naturelle in Paris (see Table 1 for voucher numbers). DNA was extracted from these samples using the Nucleospin Tissue Kit (marketed by Macherey Nagel), following the manufacturer's protocol. A fragment of the cytochrome oxidase subunit I (COI) gene was amplified by PCR using the universal primers LCO1490 and HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) or our own designated primers (CO1UnioF: TGTTAGCTTTGTGATCTGGGTTAATTGG; CO1UnioR: AAATTGGATCACCTCCCCCAGTAGGG). The PCR mix contained 20 ng of DNA, 1U of Fast Start Taq (commercialized by Roche), 6 pmol of dNTP mix, 37.5 pmol of MgCl₂, 1 pmol of each primer and H₂O was added for a final volume of 50 ml. PCR started with an initial denaturation cycle at 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR products were purified using Nucleofast Plates (commercialized by Macherey Nagel) and sequenced in a 3730XL genetic analyser (Applied Biosystems). Extractions, amplification and sequencing were performed by Genoscreen (France) and Eurofins (Germany).

Fifteen sequences from Araujo *et al.* (2005) (for *U. mancus*) and from Soroka (2010) (for *U. pictorum*) were downloaded from GenBank and included in the analyses (see Table 1 for GenBank accession numbers). These were selected because the sequences are linked to voucher specimens.

The 154 sequences obtained in this study and the 15 sequences downloaded from GenBank were aligned using ClustalW multiple alignment implemented in Bio-Edit (Hall, 1999). MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) was used to calculate the p distances between each pair of specimen. The GTR + I + G model was identified as the best-fitting substitution model by JModeltest 0.1.1 (Posada, 2008) following the Akaike criterion. This model has been used for the Bayesian analysis, performed running two parallel analyses in MrBayes (Huelsenbeck *et al.*, 2001), consisting each of two Markov chains of 15 000 000 generations each, sampled every 5000 generations. A consensus tree was then calculated after omitting the first 25% trees as burn-in.

The Bayesian analyses were run on the 26 different haplotypes obtained from the 169 sequences involved in this study. *Unio tumidus* Philipsson, 1788 and *Unio crassus* Philipsson,

1788 were chosen as outgroups, as they are considered to be closely related to *U. mancus* and *U. pictorum* (Nagel and Badino, 2001). *Margaritifera auricularia* Spengler, 1793 was chosen as distant outgroup to assess the monophyly of *U. mancus* and *U. pictorum*.

RESULTS

On the phylogenetic tree (Figure 2), three main clades were defined. Sequences from GenBank identified as *Unio mancus* by Araujo et al. (2005) clustered in clade 1 together with our own material of *U. mancus* and its subspecies. Specimens from the Italian lake cluster in clade 2. Sequences of specimens identified as *U. pictorum* by Soroka (2010) all clustered in clade 3 together with our own material of *U. pictorum*. Average divergence within the *U. pictorum* clade was 0.3% (max: 1%), average divergence within the *U. mancus* clade was 0.5% (max 1.3%), minimum distance between *U. mancus* and *U. pictorum* was 2.9%. *U. mancus* and *U. pictorum* were found monophyletic.

U. pictorum has been found mainly in northern France (Seine and Meuse basins), with isolated populations in Lake Bourget, Lake Brindos, Gave de Pau and the Garonne basin, suggesting a broader distribution but scattered occurrences (Figure 3, Table I). *U. mancus* is found in the Mediterranean drainages of France and eastern Spain to the Seine basin in the north. Beyond this presumably natural distribution, *Unio mancus* occurs in the Rhine, and Glöer and Zettler (2005) have suggested that this is the result of an expansion through the Rhine-Rhône canal (established in 1833), where it was not reported before 1911 (as *Unio voltzii* (Kobelt, 1911); see Haas, 1969). *U. mancus* has not been found in the Meuse River.

Specimens from Lake Maggiore in Italy have been referred to “*U. pictorum mancus*” by Ravera et al. (2007), while Gavetti et al. (2008) identify them as *U. mancus*. The specimens from Lake Maggiore form a distinct lineage from *U. mancus* (Figure 2, clade 2), which is identifiable as *Unio elongatulus*, after Bodon et al. (1995) and the Italian fauna Checklist (www.faunaitalia.it). Within the *U. mancus* clade, populations were divided in three geographic groups (Figure 3): Group 1a included the populations from Atlantic drainages (Loire, Garonne), plus the Mediterranean populations from Spain and from the Basse River near Perpignan (posterior probabilities = 1); group 1b included the populations from Corsica and South-East France, i.e. drainage systems East of the Rhône (posterior probabilities = 0.86); group 1c the populations from the Rhône, Hérault and Seine drainages (posterior probabilities = 0.45). These three evolutionary units are characterized by several diagnostic characters: clade 1a differs from all other by three fixed apomorphies (bp 448: T instead of C; bp 478: A instead of G; bp 518: G instead of A), clade 1b by one apomorphic character (bp 169: A instead of G) and clade 1c by one apomorphy (bp 346: G instead of A). On the three specimens from Lake Bourget attributable to *U. mancus*, one constitutes a distinct haplotype with only one different character (bp 455: G instead of T). *U. m. turtonii* is not distinct from continental populations of South-East France (Argens). *U. m. moquinianus* and *U. m. aleronii* cluster in the same group as the nominate *U. m. mancus* (Loire), and their haplotypes are shared by most of the specimens sampled (none of them constitute a distinct clade). Specimens from the type locality of *U. m. brindosianus* were found to belong to the *U. pictorum* clade, as well as two specimens from Lake Bourget that did not differ in shell shape from *U. mancus* from the same locality (Figures 4I–4J).

DISCUSSION

> VALIDITY OF UNIO MANCUS

Haas (1969) suspected the possible existence of hybrids between *U. mancus* and *U. pictorum* in the Seine and Marne Rivers. Nagel and Badino (2001) considered them conspecific. Our results support the distinction between *U. mancus* and *U. pictorum*, the former currently

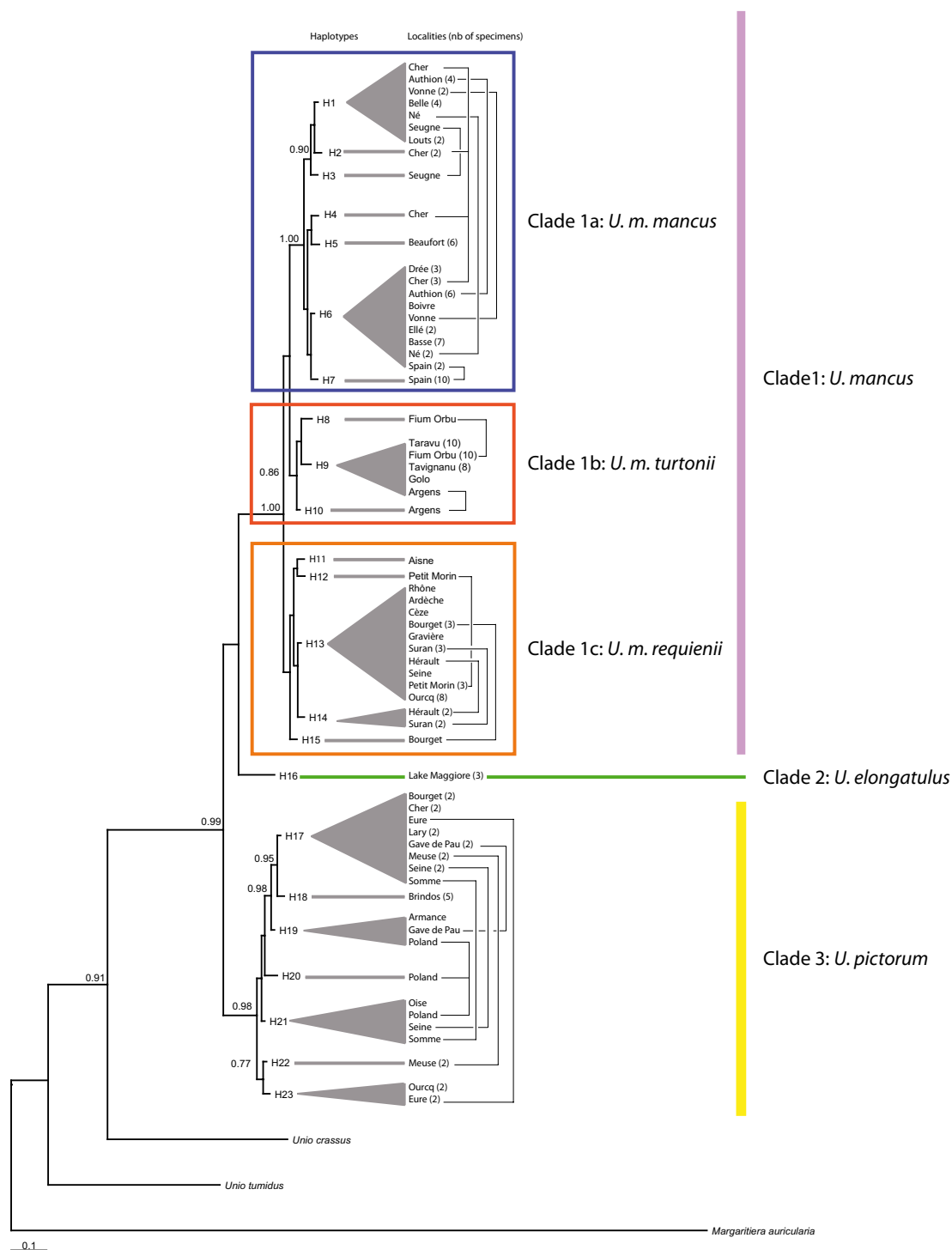


Figure 2
 Bayesian phylogenetic tree of French and Spanish populations of *U. mancus*, *U. elongatulus* and *U. pictorum*. Posterior probabilities are indicated for each node (when >0.70). H1 to H23: haplotype numbers. Rivers are given after haplotypes numbers. Black lines link up haplotypes from the same locality. Clades 1, 2 and 3 and groups 1a, 1b and 1c are highlighted. Blue = clade 1a, red = clade 1b, orange = clade 1c, purple = *U. mancus*, green = *U. elongatulus*, yellow = *U. pictorum*.

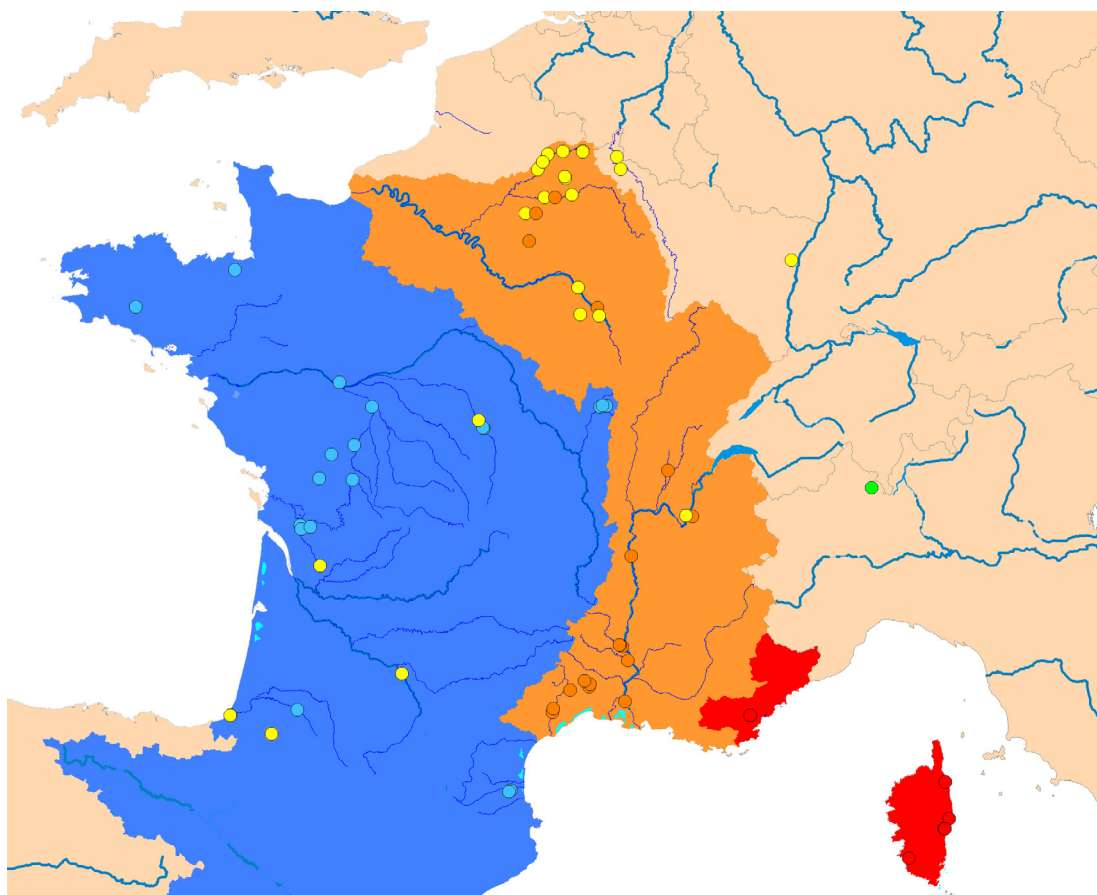


Figure 3

Putative distribution of the subspecies of *U. mancus* inferred from main drainage systems. Blue, *U. m. mancus*; orange, *U. m. requienii*; red, *U. m. turtonii*. Yellow circles, *U. pictorum* sample sites; green circle, *U. elongatulus* sample site.

present in the Atlantic drainages from the Pyrenees to the small drainages of Brittany, in the Seine basin in upstream Aisne and Marne Rivers, and in Mediterranean drainages, Corsica included. Furthermore, these populations are conspecific with *U. mancus* as identified by Araujo *et al.* (2005) in Spain. The species level status of *mancus* is further supported by the syntopic co-occurrence of *U. mancus* and *U. pictorum* in Lake Bourget and in the Cher, Ourcq, Seine and Aisne Rivers (Figure 3, Table I).

Within *Unio mancus*, the French populations cluster in three COI sequences groups (1a, 1b and 1c) that do not correspond to the subspecies delimitations proposed by Haas (1969) and retained by Falkner *et al.* (2002). However, although sampling topotypes is in principle the most reliable approach to evaluate the status of a nominal (sub)species, it is not certain that material collected in 2010–2011 belongs to the same gene pool as the specimens occupying the type localities in the mid-19th century, when the nominal species were described. Aquatic ecosystems have been strongly impacted by human activities over the last century. Water quality has been globally declining, sediment quality has been modified by dams and channelization (Sabater, 2008; Sabater and Tockner, 2009), and these changes may have locally led to extirpation of populations. Previously isolated drainage systems are now connected by canals and through fish translocation, which induce translocation of associated bivalves through the larval parasitic stage (Nagel, 2000; Gherardi *et al.*, 2008; Cappelletti *et al.*, 2009), resulting in new gene pools being introduced to old localities. Because of the potential colonization and

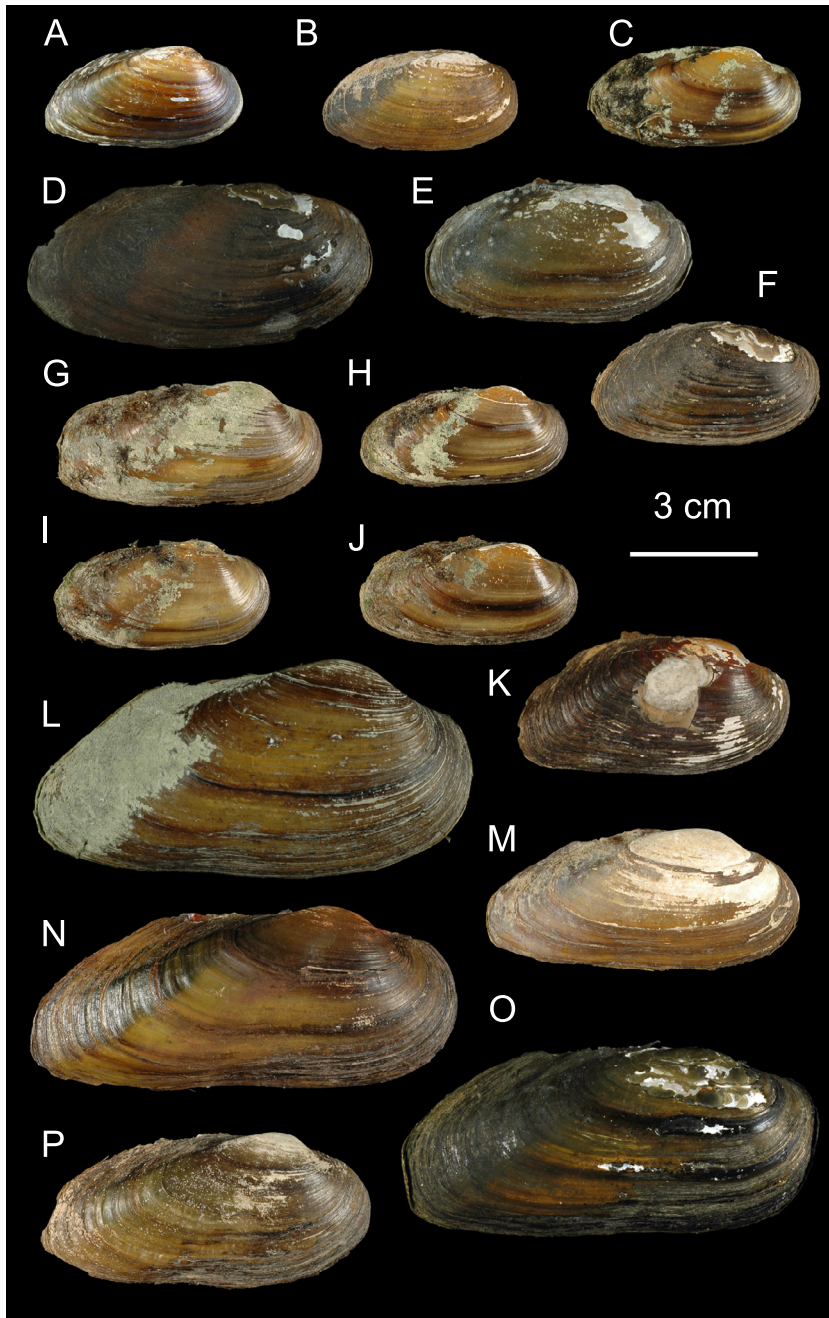


Figure 4

Morphological variability of *U. mancus* in France. A: *U. m. mancus*, lectotype. River Drée, Bourgogne, MNHN 24632; B: *U. m. mancus*, River Vonne at Soudan (Loire-Atlantique), MNHN IM-2009-12668; C: *U. m. mancus*, River Ellé at Meslan (Morbihan), MNHN IM-2009-17788; D: *U. m. mancus*, River Basse at Toulouges (Pyrénées-Orientales), MNHN IM-2009-17815; E: *U. m. mancus*, River Loutz at Lacajunte (Landes), MNHN IM-2009-12599; F: *U. m. requienii*, River Aisne at Bourg-et-Comin (Aisne), MNHN IM-2009-17803; G: *U. m. requienii*, Lake Bourget at Chindrieux (Savoie), MNHN IM-2009-12701; H: *U. m. requienii*, Lake Bourget at Chindrieux (Savoie), MNHN IM-2009-12707; I: *U. pictorum*, Lake Bourget at Chindrieux (Savoie), MNHN IM-2009-12703; J: *U. pictorum*, Lake Bourget at Chindrieux (Savoie), MNHN IM-2009-12705; K: *U. bourgeticus*, syntype, MNHN 22139; L: *U. mancus requienii*, possible topotype, Lake Gravières at Arles (Bouches-du-Rhône), MNHN IM-2009-17775; M: *U. mancus requienii*, River Rhône at Sablons (Isère), MNHN IM-2009-12605; N: *U. mancus requienii*, River Hérault at Bélarga (Hérault), MNHN IM-2009-12569; O: *U. mancus turtonii*, River Orbu at Ghisonaccia (Haute-Corse), MNHN IM-2009-12736; P: *U. mancus turtonii*, River Argens at Le Muy (Var), MNHN IM-2009-12579. All specimens with an IM catalog number prefix are sequenced vouchers.

introgression, the geographical genetic structuring observed in the 21st century may thus be different from that in the 19th century when names were established. Sampling of specimens at the type locality is thus not sufficient to guarantee that the specimens are genuinely representative of nominal (sub)species originally described from that locality. To avoid a wrong application of the name to supposedly topotypical specimens, it is thus essential to compare them morphologically to the historical type specimens (when available).

With this caveat in mind, it is not entirely certain that present-day populations in Lake Bourget (type locality of *U. m. bourgeticus*) represent the same gene pool as in the 1880s. The specimens sampled (Figures 4G–4J) have uniformly small, brownish and rounded shells that do seem similar to the type specimens (MNHN 22139, Figure 4K), but the latter are more kidney-shaped. Furthermore, whereas based on COI sequences evidence both *U. pictorum* and *U. mancus* are now present in the lake, we found no morphological differences between them. If this situation existed already in the 19th century, then the allocation of the type material of *Unio bourgeticus* to either *U. mancus* or *U. pictorum* is problematical.

Likewise, the specimens sampled in Lake Brindos (type locality of *U. m. brindosianus*) were all attributable to *U. pictorum* according to COI sequences, but it is not clear whether they correspond genuinely to what was historically described as *U. brindosianus* (which would then be a synonym of *U. pictorum*), or whether *U. mancus* has been extirpated from that locality and replaced by the ecologically more tolerant *U. pictorum*.

> EVALUATION OF THE MORPHOLOGICAL VARIABILITY

Important morphological variations exist in shell size, shape and colour of *U. mancus* (Figure 4, more material is illustrated in Prié, 2012).

Specimens from the Loire (Figure 4B) and Seine drainages (Figure 4C), including the nomenclatural lectotype designed by Falkner (1994) (Figure 4A), have small-sized, elongated, and rather yellowish shells; by contrast, specimens from Brittany have larger and much darker shells (Figure 4D). The population from the Basse River (type locality of *U. m. aleronii*, Figure 4E) is characterized by small, ovate, rather greenish shells. Their COI sequences are similar to those from Atlantic drainages and to the morphologically very different specimens from Spain (Araujo et al., 2005; Araujo et al., 2009c). The sampled population from the Adour drainage (Pyrenees) has small and rounded shells (Figure 4F), with a very dark color, that corresponds to the original description of *U. m. moquinianus* and its taxonomical extension in Haas (1969). Their COI sequences belong to the same clade as populations from the Loire and Charente Rivers, which have very different shell shape and color.

Specimens from Lake Bourget (Figures 4G–4J) are morphologically homogeneous, with shells resembling those from the Aisne River, but their COI sequences correspond to two species, *U. pictorum* and *U. mancus*. However, none of the specimens sampled matches perfectly the kidney-shape and dark shells of 19th century historical type specimens (Figure 4K).

Populations from Corsican and Mediterranean drainages have large, often kidney-shaped shells with a brownish colour (Figures 4L–4O). They belong to two distinct clades, one of them, despite different shell shapes, including the Lake Bourget and Seine basin populations. Material from Corsica matches the original description of *U. m. turtonii*, but this description is vague enough to correspond to any *U. mancus* population from southern France. Characters such as the thickness of the shells are most probably linked to water quality: Corsican populations of *U. mancus* live on an acid substrate whereas the mainland populations sampled live mainly on limestone.

Incongruence of morphology with DNA sequences data has been noted in previous studies (Nagel, 1992; McMurray et al., 1999; Zieritz et al., 2010). Because the historically restricted-range *U. m. aleronii*, *U. m. bourgeticus* and *U. m. moquinianus* cannot be separated by COI sequences, there is no support to regard them as separate taxa despite their morphological singularities.

> STRUCTURING WITHIN *U. MANCUS*

Despite the weak posterior probabilities, the genetic structure within *U. mancus* is biogeographically cohesive and coherent, supporting the recognition of three different evolutionary/conservation units corresponding to the three groups 1a, 1b and 1c (Figure 3).

Group 1a includes the populations from Atlantic drainages, from the Pyrenees to Brittany, including the Loire basin, as well as the population from the Basse River in Perpignan. Outside France, it includes Spanish Mediterranean drainages as far South as the Jucar River basin. This clade corresponds to the subspecies *Unio m. mancus*, *Unio m. aleronii*, *U. m. moquini-anus* as recognized by Falkner *et al.* (2002), and should thus be known as the nominotypical subspecies *Unio m. mancus*, with the other names as synonyms. The genetic similarity between populations from the Loire and the Adour-Garonne systems was not expected as the Adour and Garonne drainages have to this day remained unconnected by canals (Persat and Keith, 2011). This distribution matches that of *Leuciscus burdigalensis* (Valenciennes, 1844) (with the taxonomic extension of Keith *et al.*, 2011). Interestingly, the genus *Leuciscus* Cuvier, 1816 is closely related to *Squalius* Bonaparte, 1837, which includes two species known as efficient host fishes for *U. mancus* (Araujo, 2005), suggesting that *L. burdigalensis* should be tested as a larval host for *Unio mancus*. The co-clustering of populations from Spanish Mediterranean drainages and French Atlantic drainages evidences that, counter-intuitively, the Pyrenees are not a significant biogeographic barrier. Interestingly, fishes like the Iberian gudgeon *Gobio lozanoi* Doadrio and Madeira, 2004 or the Adour minnow *Phoxinus bigerri* Kottelat, 2007 are also distributed in both the Ebro basin in Spain and the Adour basin in the French Atlantic drainage (Keith *et al.*, 2001; Kottelat and Freyhof, 2007). The distribution of *Squalius laietanus* (Doadrio *et al.*, 2007), including the Ebro basin and the southernmost French Mediterranean Rivers (Keith *et al.*, 2001; Kottelat and Freyhof, 2007), parallels that of clade 1a in the Basse River. Such distributions may have their origin in the connections between French and Spanish hydrographic systems during periods of low sea levels (Persat and Keith, 2011).

The Rhône, Vidourle and Hérault rivers have been connected in the past when the sea level was lower, which can explain the similarity of fauna in the rivers draining to the Golfe du Lion (Persat and Keith, 2011). This is congruent with the COI sequences results in our analysis. By contrast, an unexpected result of our study was the allocation of specimens from the Seine drainage system to clade 1c. This was unexpected as the fauna of the Seine is in general more similar to that of the Loire due to (i) connections during geological time until the early Pleistocene, and (ii) historically (year 1642), the opening of the canal de Briare connecting the Loire and the Loing (a tributary of the Seine). The artificial connection between the Rhône and the Seine systems was established later in 1832 (through Canal de Bourgogne between Ouch and Armacon Rivers) and 1907 (canal between the Saone and Marne Rivers). We hypothesize that the occurrence of *U. mancus* in the Seine is the result of a modern colonization event, either *via* canals or fish translocation.

Falkner *et al.* (2002) restricted the name *U. m. turtonii* to Corsican populations and questioned the identity of populations for continental rivers East of the Rhône. The clustering of COI sequences of specimens from South-East France and Corsica in group 1b is congruent with Germain's (1931) opinion, and the name *U. m. turtonii* is applicable to it.

Clade 1c corresponds to the subspecies *U. m. requienii* as recognized by Falkner *et al.* (2002), but with a distribution here extended to the Hérault River and to the Seine system. (The identity of *U. m. bourgeticus*, from the Rhône drainage, remains in doubt as collected material seems different from type material, but it is probably a synonym of *U. m. requienii*).

> CONSERVATION ISSUES

When the appendices to the Habitats and Species Directive (92/43/EEC) were put together back in the early 1990s (see Bouchet *et al.*, 1999 for a history of how the list was compiled), the prevailing scientific opinion was that *Unio pictorum* was a polytypic species, with

a broad range extending from Portugal to Estonia, and was not endangered. The then poorly known *U. mancus* was not explicitly considered, and was probably implicitly considered to be part of the variation of *U. pictorum* (e.g. in the Habitats Directive) or *U. elongatulus* (e.g. in the Bern Convention). The recognition of *U. mancus* as a distinct species, endemic to a few drainages in France and Spain, has of course radical consequences in a conservation perspective (Morrison *et al.*, 2009).

Extensive sampling in the main drainages in the course of the present study resulted in the discovery of healthy populations of *Unio mancus*, particularly in Atlantic drainages, as well as healthy populations of *U. crassus*, a species considered endangered, protected in France and listed in the Habitats Directive. However, compared to *U. crassus*, *U. mancus* has a much more restricted range, with drainages in Mediterranean and southwestern France contributing most populations. These drainages are heavily impacted by human activities and systematic sampling of historical localities indicates an important decline of populations, giving cause of concern for their conservation status.

Intensive farming produces considerable pollutants effluents: 73 000 tons of phytosanitary products have been used in France in 2004, and pesticides have been detected in 96% of French rivers checkpoints (IFEN, 2006). Dams and impoundments for irrigation are a primary cause of fragmentation and habitat loss due to siltation (Strayer, 2006; Sabater, 2008); water extraction and severe droughts heighten the concentration of pollutants and eutrophication effects (Sabater and Tockner, 2009). It thus does not come as a surprise that the distributions and abundances of unionids in French rivers differ – sometimes considerably – from what can be inferred from 19th century publications. For instance, the type localities of *U. m. moquinianus* do not seem to host *Unio* species any more: the Echez and Arros Rivers are both highly impacted by intensive corn farming. Only a few live specimens were found in the Drée River (type locality of *U. m. mancus*), whereas numerous recently dead specimens covered the river bed, indicating a recent die-off. The Drée River is subject to recurrent pollution from malfunctioning sewage treatment plants, and an important pollution, involving fish mortality, occurred in summer 2010 during a low water event. Although we could find living *Unio* in Lake Brindos, these were very scarce and no juveniles were encountered, indicating a declining population. Indeed, the site is affected by heavy organic siltation, the substrate is dominated by anoxic sludge, and the survival of this population is obviously compromised. As noticed above, specimens collected in Lake Le Bourget differ morphologically from specimens historically collected in that lake, and a doubt remains concerning the survival of such historical *U. m. bourgeticus* morphotypes.

Populations in the Mediterranean drainages have become very restricted and demographically weak. Mediterranean rivers are affected by water restriction, which increases the effect of other stressors such as pollutants, UV-impact and thermal stress (Tockner *et al.*, 2010), and should be even more impacted by human activities and global changes in the future (Alcamo *et al.*, 2007; Sabater and Tockner, 2009). French Mediterranean drainages are home to two subspecies, for which conservation efforts should be considered. In Corsica, *U. m. turtonii* was historically known from at least eight rivers (Payraudeau, 1826), which have all been resurveyed (this paper and Araujo, pers. com.); *Unio m. turtonii* has likely been extirpated from three of these sites. It also seems to have recently been locally extirpated from the River Argens by a major flood that occurred in December 2010 after our sampling had taken place. The type locality of *U. m. aleronii* in the Basse River is now restricted to a stretch of a few hundreds of meters, between the suburbs of Perpignan downstream and the newly built railway line upstream.

Robust taxon delimitation of, and within, *U. mancus* thus suggests its conservation status should be revised to take into account the impact of habitat degradation on the size and number of populations of its constituent subspecies or evolutionary units.

> IUCN CATEGORIZATION

U. mancus is currently considered “Near Threatened” on the IUCN European Red List of Non-Marine Molluscs (Cuttelod *et al.*, 2011). At the time when the Red List was compiled (2009), criterion A (declining population) was not used as no precise data were available to support it. This is the unfortunate fate of invertebrate taxa: despite evidence of an alarming global decline of non-marine molluscs (Lydeard *et al.*, 2004), we generally lack proper data to assess population decline for each taxon considered. In this paper, 18 historical localities have been re-sampled. Despite an intensive search involving several prospectors and appropriate approaches (aquascope, dredging, scuba diving), the result was that 10 of these 18 populations have been extirpated since the early 1900s and four out of the remaining eight are declining. Moreover, global decline can be inferred from the well documented decline of habitat and water quality. It is therefore likely that population reduction has reached over 50% during the 20th century. The causes are not clearly understood, they have not ceased and are in most cases not reversible; inferred decline is based on direct observation, decline in Area Of Occurrence (AOO), and effect of pollutants. Based on these considerations, *U. mancus* meets the criteria A2ace to categorize as “Endangered”.

With regard to criteria B (restricted range and fragmentation, decline or fluctuations) and C (small population size and decline or fluctuations), *U. mancus* has a relatively large distribution (about 800 000 km², based on river basins) and healthy populations are known. Given this distribution and occurrence, criteria B and C are not globally applicable, but the present study stresses out the “severely fragmented” option in criterion B, which should be taken into account. Different COI lineages have been revealed in France but, although COI evolves at a fast rate, it is not enough to reveal population isolation nowadays. Therefore, fragmentation may be higher than suggested by COI sequences. Further studies on population genetics may highlight distinct populations most likely isolated in independent hydrosystems.

Fragmentation and decline are an established fact, especially with regard to *U. m. turtonii* known only from six locations: one on the mainland (the population sampled by us has since been extirpated but specimens probably survive elsewhere in the River Argens), five in Corsica, with extirpation from three further localities within a century. However, total population probably exceeds 10 000 individuals, and criterion C is not applicable. Criterion D (very small population or very restricted distribution) and E. (Quantitative analysis of extinction risk) are not applicable either.

Each of the three subspecies of *Unio mancus* recognized in the present study should arguably be considered as “Endangered”. Despite a more restricted range and higher anthropogenic pressure on *U. m. turtonii*, it does meet the IUCN criteria for “Critically Endangered”.

ACKNOWLEDGEMENTS

Benjamin Adam (BIOTOPE), Michel Bramard (ONEMA), Xavier Cucherat (BIOTOPE), Erwann Jacquin (Deli-Sports), Florent Lamand (ONEMA), Joseph Matei (ONEMA), Marie-Lilith Patou (BIOTOPE), Pierre-Yves Pasco (SEPNB-Bretagne vivante), Henri Persat (LEHNA), Oscar Ravera (CNR – Institute of Ecosystem Study), Ludwick Simon (BIOTOPE) took part in the sampling effort. Gérard Tardivo (DREAL Centre) allowed obtaining a special authorization for sampling protected species *U. crassus* and *M. auricularia*. This study was completed with financial support of BIOTOPE (PI Frederic Melki) and grants from MNHN ATM Barcode (PIs Sarah Samadi and Jean-Noël Labat) and ANR 6eme extinction (PI Philippe Bouchet).

REFERENCES

- Agrell I., 1948. The shell morphology of some Swedish unionids as affected by ecological conditions. *Arkiv för Zoologi*, 41A, 1–30.
- Alcamo J., Flörke M. and Märker M., 2007. Future long-term changes in global water resources driven by socioeconomic and climatic change. *Hydrol. Sci. J.*, 52, 247–275.

- Araujo R., Gomez I. and Machordom A., 2005. The identity and biology of *Unio mancus* (Lamarck, 1819) (= *U. elongatulus*) (Bivalvia: Unionidae) in the Iberian Peninsula. *J. Mollus. Stud.*, 71, 25–31.
- Araujo R., Toledo C. and Machordom A., 2009a. Redescription of *Unio gibbus* (Spengler, 1793), a west palaeartic freshwater mussel with hookless glochidia. *Malacologia*, 51, 131–141.
- Araujo R., Toledo C., Van Damme D., Ghamizi M., and Machordom A., 2009b. *Margaritifera marocana* (Pallary, 1918): A valid species inhabiting Moroccan rivers. *J. Mollus. Stud.*, 75, 95–101.
- Araujo R., Reis J., Machordom A., Toledo C., Madeira M.J., Gómez I., Velasco J.C., Morales J., Barea J.M., Ondina P. and Ayala I., 2009c. Las náides de la península ibérica. *Iberus*, 27, 7–72.
- Bodon M., Favilli L., Giusti F. and Manganelli G., 1995. Gastropoda Pulmonata. In: Minelli A., Ruffo S. and La Posta S. (eds.), Checklist delle specie della fauna italiana, Bologna (Calderini), 14, 1–160.
- Bouchet P., 2002. Mollusques terrestres et aquatiques de France : un nouveau référentiel taxonomique, un nouveau départ, de nouvelles perspectives. In: Falkner G., Ripken T.E.J. and Falkner M. (eds.), Mollusques continentaux de France : Liste de Référence annotée et Bibliographie. *Patrimoines Naturels*, 52, 5–20.
- Bouchet P., Falkner G. and Seddon M., 1999. Lists of protected land and freshwater molluscs in the Bern Convention and European Habitats Directive: are they relevant to conservation? *Biol. Conserv.*, 90, 21–31.
- Cappelletti C., Cianfanelli S., Beltrami M.E. and Ciutti F., 2009. *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionidae): A new non-indigenous species in lake Garda (Italy). *Aquat. Invas.*, 4, 685–688.
- Cuttelod A., Seddon M. and Neubert E., 2011. European Red List of Non-marine Molluscs, IUCN, Luxembourg, Publications Office of the European Union, 97 p.
- Falkner G., 1994. Systematik vorderorientalischer Najaden als Vorstudie zur Bearbeitung archäologischer Funde. In: Kokabi M. and Wahl J. (eds.), Beiträge zur archäozoologie und prähistorischen Anthropologie, Forschungen und Bearbeitung archäologischer Funde, Forschungen und Berichte zur Vor- und Frühgeschichte in Baden-Württemberg, Stuttgart (K. Theiss), 53, 135–162.
- Falkner G., Ripken T.E.J. and Falkner M., 2002. Mollusques continentaux de France, Liste de référence annotée et bibliographie. *Patrimoines Naturels*, 52, 350 p.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R. and Vrijenhoek R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit i from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Gavetti E., Birindelli S., Bodon M. and Manganelli G., 2008. Molluschi terrestri e d'acqua dolce della Valle di Susa Monografie di Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino, Beinasco, 44, 274 p.
- Geist J. and Kuehn R., 2005. Genetic diversity and differentiation of central European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) populations: Implications for conservation and management. *Mol. Ecol.*, 14, 425–439.
- Germain L., 1931. Mollusques terrestres et fluviatiles, Faune de France, Paris (Lechevalier), 477 p.
- Gherardi F., Bertolino S., Bodon M., Casellato S., Cianfanelli S., Ferraguti M., Lori E., Mura G., Nocita A., Riccardi N., Rossetti G., Rota E., Scalera R., Zerunian S. and Tricarico E. 2008. Animal xenodiversity in Italian inland waters: Distribution, modes of arrival, and pathways. *Biol. Invas.*, 10, 435–454.
- Glöer P. and Zettler M.L., 2005. Kommentierte Artenliste der Süßwassermollusken Deutschlands. *Malakologische Abhandlungen*, 23, 3–26.
- Haas F., 1969. *Superfamilia Unionacea*, Das Tierreich, 88, 663 p.
- 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.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. and Hall B., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
- IFEN 2006. Les pesticides dans les eaux, données 2003 et 2004. In: Nirascou F. (ed.), Les Dossiers de l'IFEN Institut Français de l'Environnement, Orléans, 38 p.
- Keith P., Persat H., Feunteun E. and Allardy J. (eds.), 2011. Les poissons d'eau douce de France, Editions Biotope-Mèze and MNHN-Paris, 552 p.
- Khalloufi N., Toledo C., Machordom A., Boumaïza M. and Araujo R., 2011. The unionids of Tunisia: Taxonomy and phylogenetic relationships, with redescription of *Unio ravoisieri* (Deshayes, 1847) and *U. durieui* (Deshayes, 1847). *J. Mollus. Stud.*, 77, 103–115.

- Kottelat M. and Freyhof J., 2007. Handbook of European freshwater fishes, Published by the authors, 666 p.
- Lydeard C., Cowie R.H., Ponder W.F., Bogan A.E., Bouchet P., Clark S.A., Cumming K.S., Frest T.J., Gargominy O., Herbert D.G., Hershler R., Perez K.E., Roth B., Seddon M., Strong E.E and Thompson F.G., 2004. The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience*, 54, 321–330.
- Mace G.M., 2004. The role of taxonomy in species conservation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, 359, 711–719.
- Machordom A., Araujo R., Erpenbeck D. and Ramos M.A., 2003. Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionioidea). *Biol. J. Linn. Soc.*, 78, 235–252.
- Master L.L., Stein B.A., Kutner L.S. and Hammerson G.A., 2000. Vanishing assets: Conservation status of U.S. Species. In: Stein B.A., Kutner L.S. and Adams J.S. (eds.), Precious heritage: The status of biodiversity in the United States New York, Oxford University Press, 93–118.
- May R., 1990. Taxonomy as destiny. *Nature*, 347, 129–130.
- McMurray S.E., Schuster G.A. and Ramey B.A., 1999. Recruitment in a freshwater unionid (Mollusca: Bivalvia) community downstream of Cave Run Lake in the Licking River, Kentucky. *Amer. Malac. Bull.*, 15, 57–63.
- Morrison W.R., Lohr J.L., Duchon P., Wilches R., Trujillo D., Mair M. and Renner S.S., 2009. The impact of taxonomic change on conservation: Does it kill, can it save, or is it just irrelevant? *Biol. Conserv.*, 142, 3201–3206.
- Nagel K.O., 1992. Das Schalenwachstum dreier Muschelarten (Bivalvia: Unionidae) in der Schwalm, einem nordhessischen Mittelgebirgsfluß. *Decheniana*, 145, 165–176.
- Nagel K.O., 2000. Testing hypotheses on the dispersal and evolutionary history of freshwater mussels (Mollusca: Bivalvia: Unionidae). *J. Evol. Biol.*, 13, 854–865.
- Nagel K.O. and Badino G., 2001. Population genetics and systematics of the European Unionidae. In: Bauer G. and Wächtler K. (eds.), Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionidae, *Ecol. Stud.*, 1454, 51–81.
- Ortmann A.E., 1920. Correlation of shape and station in freshwater mussels (Naiades). *Proc. Am. Philos. Soc.*, 59, 268–312.
- Payraudeau B.-C., 1826. Catalogue descriptif et méthodique des Annélides et des Mollusques de l'île de Corse. Bechet, Levrault, Paschoud, Treuttel and Wurtz, Paris, 218 p.
- Persat H. and Keith P., 2011. Biogéographie et historique de la mise en place des peuplements ichthyologiques de France métropolitaine. In: Keith P., Persat H., Feunteun E. and Allardy J. (eds.), Les poissons d'eau douce de France, Editions Biotope-Mèze and MNHN-Paris, 552 p.
- Posada D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.*, 25, 1253–1256
- Prié V., 2012. Les sous-espèces de la Mulette méridionale *mancus* (Lamarck 1819) (Bivalvia, Unionioidea) en France : descriptions originales et matériel topotypique. *MalaCo*, 8, 428–446.
- Ravera O., Frediani A. and Riccardi N., 2007. Seasonal variations in population dynamics and biomass of two *Unio pictorum mancus* (Mollusca, Unionidae) populations from two lakes of different trophic state. *J. Limnol.*, 66 15–27.
- Reis J. and Araujo R., 2009. Redescription of *Unio tumidiformis* (Castro, 1885) (Bivalvia, Unionidae), an endemism from the south-western Iberian peninsula. *J. Nat. Hist.*, 43, 1929–1945.
- Sabater S., 2008. Alteration of the global water cycle and their effects on river structure, function and services. *Freshwater Reviews*, 1, 75–88.
- Sabater S. and Tockner K., 2009. Effects of hydrologic alterations on the ecological quality of river ecosystems. In: Sabater S. and Barcelo D. (eds.), Water scarcity in the Mediterranean: Perspectives under global change Springer Berlin, Heidelberg, 15–39
- Schonewald-Cox C.M., Chambers S.M., Macbryde B. and Thomas L., 1983. Genetics and conservation, Menlo Park, Benjamin/Cummings, California, 722 p.
- Soroka M., 2010. Characteristics of mitochondrial DNA of unionid bivalves (Mollusca: Bivalvia: Unionidae). I. Detection and characteristic of double uniparental inheritance (DUI) of unionid mitochondrial DNA. *Folia Malacologica*, 18, 147–188.
- Strayer D.L., 2006. Challenges for freshwater invertebrate conservation. *J. North Am. Benthol. Soc.*, 25, 271–287.

- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum Parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28, 2731–2739.
- Tockner K., Pusch M., Borchardt D. and Lorang M.S., 2010. Multiple stressors in coupled river-floodplain ecosystems. *Freshwater Biol.*, 55, 135–151.
- Watters G.T., 1994. Form and function of unionoidean shell sculpture and shape (Bivalvia). *Amer. Malacol. Bull.*, 11, 1–20.
- Zieritz A. and Aldridge D.C., 2009. Identification of ecophenotypic trends within three European freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida) using traditional and modern morphometric techniques. *Biol. J. Linn. Soc.*, 98, 814–825.
- Zieritz A., Hoffman J.I., Amos W. and Aldridge D.C., 2010. Phenotypic plasticity and genetic isolation-by-distance in the freshwater mussel *Unio pictorum* (Mollusca: Unionoida). *Evol. Ecol.*, 24, 923–938.

II.1.2 Structuration génétique de *Potomida littoralis* en Europe (COI & 16S)

J'ai travaillé sur la structuration génétique de *P. littoralis* à l'échelle du paléarctique occidental. Les gènes étudiés sont les gènes mitochondriaux COI et 16S. On observe une structuration géographique entre les spécimens européens, nord-africains et turcs, ces derniers étant attribuables à une espèce distincte, *P. semirugata* (Lamarck, 1919). En revanche, si deux clades distincts sont observés en Europe, ils ne sont pas calqués sur le réseau hydrographique, malgré la présence des Pyrénées entre la France et la péninsule ibérique, qui pourraient constituer une barrière géographique importante. Ces deux clades ont une faible divergence (1,8%), qui ne justifie pas de les considérer comme deux espèces distinctes, ni même comme des sous-espèces puisqu'ils sont sympatriques. En l'absence d'autres marqueurs, tous les échantillons étudiés semblent appartenir à la même unité taxonomique : *P. littoralis*. Toutefois, quatre spécimens sur les cinq étudiés présentent des haplotypes propres aux populations du bassin-versant du Rhône, ce qui peut justifier le maintien de la sous-espèce *P. l. cuneata* (Jacquemin, 1835) telle que définie par Falkner *et al.* (2002). L'unique individu présentant l'haplotype majoritaire collecté en Ardèche (bassin-versant du Rhône) pourrait résulter d'une introduction récente ou de la rétention de polymorphisme ancestral.

ARTICLE 4

Froufe, E., **Prié, V.**, Sobral, C., Teixeira A., Sousa R., Varandas, S. & Lopes-Lima, M. *soumis*. Extremely low genetic diversity within the near-threatened freshwater mussel *Potomida littoralis* (Cuvier, 1798) in Western Europe. *Journal of Biogeography*.

Article type: Original Article

Mitochondrial DNA reveals extremely low genetic diversity and an ancestral lineage of *Potomida littoralis* (Cuvier, 1798) in Western Europe

Elsa Froufe^{1, *}, Vincent Prié², Carina Sobral¹, Amílcar Teixeira³, Ronaldo Sousa^{1, 4}, Simone Varandas⁵, Manuel Lopes-Lima^{1, 6}

¹ CIIMAR/CIMAR - Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research, University of Porto, Rua dos Bragas 289, P 4050-123 Porto, Portugal.

² Museum national d'Histoire naturelle à Paris, Dpt Systématique et Evolution, USM 603/UMR 7138, Equipe "Exploration de la Biodiversité", Case Postale 51, 55, Rue Buffon, 75231, Paris Cedex 05, France.

³ CIMO-ESA-IPB - Mountain Research Centre, School of Agriculture, Polytechnic Institute of Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal.

⁴ CBMA - Centre of Molecular and Environmental Biology, Department of Biology, University of Minho, Braga, Portugal.

⁵ CITAB-UTAD - Centre for Research and Technology of Agro-Environment and Biological Sciences, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Forestry Department, Apartado 1013, 5001-811 Vila Real, Portugal.

⁶ ICBAS - Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Porto, Largo Prof. Abel Salazar n^o2, 4099-003 Porto, Portugal

*E-mail: elsafroufe@gmail.com

Running title: sympatric mtDNA lineages in *Potomida littoralis*

Abstract

Aim: Unionoid mussels are among the most critically endangered fauna and are globally in decline; however, studies on their biogeography and diversity in Europe are still scarce. The near-threatened freshwater mussel *Potomida littoralis* has a long history of taxonomic revisions, and it has been seriously declining. Therefore, we aim to assess its taxonomic status and genetic diversity across its Western European range and compare the results with North-Africa and Middle East data in order to identify the hot spots of diversity that should be targeted for conservation.

Location: Western Europe.

Methods: We analyzed mitochondrial cytochrome oxidase 1 (COI) and 16S rRNA (16S) sequence data from 19 populations in a total of 85 individuals for phylogenetic and genetic diversity analysis.

Results: The phylogeny defined two lineages: Lineage 1 includes the majority of the haplotypes from only Western Europe, while Lineage 2 includes haplotypes from Western Europe as well as the Tunisian ones. We observed no differentiation among populations, even between major river drainages, together with low genetic and nucleotide diversities, inside the widespread Lineage 1. Star-like genealogies, together with the results from the demographic history tests and the mismatch analysis suggest genuine rapid demographic expansion within Lineage 1 and are consistent with multiple refugial populations for Lineage 2. Finally, the specimen from Turkey occupies a basal position regarding the two lineages, being highly divergent from them.

Main conclusions: Given its very low genetic diversity, narrow and discontinuous distribution, in addition to recent reports showing extensive abundance and spatial distribution declines, we concluded that this species is highly vulnerable and at high conservation risk. Further, very few populations contain the great majority of the genetic diversity, i.e., the ones where the two sympatric mtDNA lineages are found and they should be taken into account for conservation plans.

INTRODUCTION

Freshwater mussels belonging to the Unionidae (Mollusca) are well-known for their ecological and conservation importance (e.g. Bogan, 2008). In ecological terms they are responsible for important ecosystem functions and services such as providing food resource to higher trophic levels, clearing the water, control of the concentration and composition of suspended particles, nutrient cycling and provision of habitat for other organisms (Mcivor, 2004; Vaughn, 2010; Sousa *et al.*, 2012). Additionally they have an unusual life cycle that requires a host, often a narrow range of fish species for larval development and dispersal (Barnhart *et al.*, 2008). Furthermore, the species definitions in bivalves have been a persistent and contentious problem, since conchological characters, traditionally used to identify taxonomic units, are of very limited value due to the high morphological plasticity of shells (Sousa *et al.*, 2007; Zieritz *et al.*, 2010).

The near-threatened freshwater mussel *Potomida littoralis* (Cuvier, 1798), has a long history of taxonomic revisions, and instability at the specific and subspecific level still persists. Due to its great phenotypic plasticity, *P. littoralis* has more than 90 synonyms (Graf, 2007). It occurs in a patchy Circum-Mediterranean distribution, from Portugal to France, Greece, the Middle East (Turkey and Syria) and Northern Africa; its presence is not recorded from Italy and the Balkans and so apparently has a disjunctive distribution (Cuttelod *et al.*, 2011). Many native European unionid species suffered serious declines in the last decades and *P. littoralis* is not an exception: it has been declining in recent decades, for example, in all Iberian populations (Pérez-Quintero, 2007; Barea-Azcón *et al.* 2008; Sousa *et al.*, 2008), has suffered an important range contraction in France, being extirpated from the north of its former distribution (Prié *et al.*, unpublished), and should be considered for full

1
2
3 protection by the European Habitats Directive (Bouchet *et al.*, 1999).

4
5 Unionids' evolution history is expected to be closely related to host fishes'. As adult
6
7 mussels are essentially sessile, dispersal among populations of freshwater mussels is
8
9 mainly a function of host fish movement due to their larvae parasitic phase on
10
11 the gills of the fishes. Phylogeographical studies in Western European (Iberia and
12
13 France) freshwater fishes often demonstrated the existence of evolutionarily distinct
14
15 groups within each species, which suggests multiple refugia during glacial cycles
16
17 (e.g. Nesbo *et al.*, 1999; Kotlik & Berrebi, 2001; Gum *et al.*, 2005; Hänfling *et*
18
19 *al.*, 2009; Keith *et al.*, 2011; Doadrio *et al.*, 2013). For all these reasons, hidden
20
21 genetic diversity among unionids is expected in Western Europe.
22
23

24
25 Therefore, the aim of this study was to assess genetic diversity of *P. littoralis* using
26
27 mitochondrial cytochrome oxidase 1 (COI) and 16S rRNA (16S) sequence data. These
28
29 two genes were selected in order to directly compare the results with published
30
31 Tunisian *P. littoralis* sequences (Khalloufi *et al.*, 2011).
32
33

34 35 36 **METHODS**

37 38 **Specimens examined**

39
40 Available sequences of *P. littoralis* mitochondrial DNA COI and 16S in GenBank
41
42 were downloaded from France, Turkey and Tunisia (Table 1). All major coastal
43
44 drainages from France, Spain and Portugal were sampled: Douro, Mondego, Tejo,
45
46 Mira, Guadiana, Guadalquivir, Barbate, Ebro, Loire, Garonne, Adour and Rhône (Table
47
48 1), for a total of 78 *P. littoralis* specimens. The locations of *P. littoralis* samples
49
50 previously available in GenBank and newly collected ones are listed in Table 1 and
51
52 shown in Fig. 1.
53
54
55
56
57
58
59
60

DNA extraction, amplification and sequencing

A small sample from the foot was collected in the field (following Naimo *et al.*, 1998), and placed directly into 99% ethanol. The whole genomic DNA was extracted from the tissue samples, using a standard high-salt protocol (Sambrook *et al.*, 1989). Two fragments of approximately 700 bp of the COI and 500 bp of the partial 16S were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers LCO22me2 and HCO700dy2 (Walker *et al.*, 2006; 2007) for the COI and 16SL and 16SH (Palumbi *et al.*, 2002) for the 16S. The PCR conditions (25 μ l reactions) were as follows: each reaction contained 2.5 μ l 10x Invitrogen PCR Buffer, 0.5 μ l 10 mM of each primer, 1.5 μ l 50 mM MgCl₂, 0.5 μ l 10 mM dNTP's, 0.1 μ l Invitrogen Taq DNA Polymerase and 1 μ l of DNA template (~ 100 ng per μ l). The cycle parameters were: initial denaturation at 94°C for 3 min, denaturation at 94°C (30 s), annealing at 55°C for COI or 49°C for 16S (45 s) and extension at 72°C (45 s) repeated for 38 cycles, with a final extension at 72°C for 5 min. Amplified DNA templates were sequenced by a commercial company (Macrogen). The new sequences obtained in this study were submitted to the GenBank (accession numbers will be available upon acceptance of the manuscript).

Analyses

Chromatograms were checked by eye using ChromasPro 1.41 (technelysium.com.au). The sequences (16S and COI) were aligned with ClustalW, using Bioedit v. 5.0.9. (Hall, 1999) and then adjusted manually. COI mtDNA sequences of *Unio mancus* (Lamarck, 1819), *Unio crassus* (Philipsson, 1788) and *Lamprotula leai* (Griffith & Pidgeon, 1833) were included as outgroups (Table 1). Since it was immediately evident that intraspecific variation was low within the 16S, sequences were joined in

1
2
3 unrooted networks using the 95% parsimony criterion implemented in the software
4
5 TCS 2.1 (Clement *et al.*, 2000). This technique is particularly suited to the analysis of
6
7 single-species gene genealogies, where ancestral and descendant haplotypes may
8
9 coexist (Posada & Crandall, 2001). Additionally the same methodology was used
10
11 with COI in order to also detect potential spatial patterns existing on these haplotype
12
13 distributions. As not all individuals had available sequences for both genes, the
14
15 phylogenetic analysis was carried out using only the COI sequences; additionally,
16
17 since the number of individuals sharing the same haplotype was very high, analysis
18
19 was performed with haplotypes only. This COI dataset was then analyzed using
20
21 maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) methods. The best-fit model
22
23 of nucleotide substitution evolution under corrected Akaike Information Criterion was
24
25 estimated using JModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). The transition model TIM1+I (I=
26
27 0.6690) was chosen. ML trees were built in PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003) with
28
29 random sequence addition (100 replicate heuristic searches) and with 1,000
30
31 bootstrap replicates (Felsenstein, 1985) searching for the best-scoring ML tree.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

To assess the levels of genetic differentiation among *P. littoralis* populations, pairwise

1
2
3 population differentiation values (Φ_{ST}) were calculated using ARLEQUIN v.3.5.1.3
4
5 (Excoffier & Lischer, 2010) and associated probability values were quantified using
6
7 uncorrected p-distance (number of nucleotide substitutions). We also did this analysis
8
9 according to the population structure visualized in the network of haplotypes and
10
11 phylogenetic trees, i.e., all haplotypes were clustered into three groups corresponding
12
13 to Lineage1, Lineage 2- Iberia+France and Lineage 2-Tunisia (see Results). The same
14
15 software was also used to calculate the analysis of molecular variance (AMOVA) to
16
17 estimate the hierarchical distribution of mtDNA genetic differentiation within and
18
19 among populations, using Φ_{ST} (from the absolute number of nucleotide differences)
20
21 and with 10,000 permutations.
22
23

24
25 Finally, in order to examine the demographic history of each of the two major clades
26
27 obtained in the phylogeny (see results; Fig. 2) and hypothesize post-Pleistocene range
28
29 expansions, we carried out a pairwise mismatch distribution (Rogers & Harpending,
30
31 1992), which can identify whether a group of related haplotypes is the likely result of
32
33 recent population expansion (Slatkin & Hudson, 1991). These authors have shown that
34
35 the distribution of pairwise differences between haplotypes in a sample will be a
36
37 unimodal Poisson-like distribution, if the haplotypes are the result of exponential
38
39 population growth, whereas a multimodal distribution is typical of stable population
40
41 sizes. Additionally, since the unimodal distribution of the mismatch distribution may
42
43 be due to both recent population expansions or recent bottleneck events (Ramírez-
44
45 Soriano *et al.*, 2008), two neutrality tests were applied: Tajima D test, and Fu's F_s test.
46
47 The first uses information on the mutation frequencies, while the latter F_s test uses
48
49 information on the distribution of haplotypes (Ramos-Onsins & Rozas, 2002).
50
51
52
53
54

55 56 RESULTS 57 58 59 60

1
2
3 The COI alignment consisted of 85 DNA sequences of *P. littoralis* specimens,
4
5 resulting in 27 distinct haplotypes, and the three outgroup sequences (Table 1).
6
7 Aligned sequences had a total length of 546 base pairs, and within *P. littoralis*, there
8
9 were 53 polymorphic and 26 parsimony-informative sites. No indels and no
10
11 unexpected stop codons were observed, after translating all sequences into amino
12
13 acids. The tree topologies resulting from the single tree recovered from the ML (-
14
15 1625.5334) and BI approaches were totally congruent. The results of the ML and
16
17 Bayesian analyses are shown in Fig. 2. *P. littoralis* is divided into two supported
18
19 clades: Lineage 1 (Fig. 2: blue) includes the majority of the haplotypes sequenced
20
21 from Iberian and French specimens without geographically related haplogroups (but
22
23 the Rhône ones, see below); Lineage 2 includes three distinct haplotypes retrieved
24
25 from ten individuals sampled in Iberian and French populations (Fig. 2: green) and
26
27 four Tunisian haplotypes, which formed a distinct supported clade within Lineage 2
28
29 (Fig. 2: red). The divergence between Lineage 1 and Lineage 2 is 2.8% and within
30
31 Lineage 2 the divergence between the two groups, i.e., Iberia + France and Tunisia, is
32
33 only 1.8% (Table 2). Surprisingly, the Iberian and French haplotypes depicted in
34
35 Lineage 2 are sympatric with haplotypes depicted in Lineage 1 (Table 1, Fig. 1 and
36
37 Fig. 2). The levels of genetic variation in *P. littoralis* were higher in Lineage 2, when
38
39 compared to Lineage 1 (Table 2). Finally, the specimen from Turkey (Whelan *et al.*,
40
41 2011) occupies a basal position regarding the two lineages and is highly divergent
42
43 from them (4.2% to 4.7%).
44
45
46
47
48

49 Very similar networks for both genes were produced at 95% confidence limit (Fig. 3).
50
51 Regarding the COI, the sample sequenced from Turkey was beyond the 95% limit (not
52
53 connecting) and is not represented in Fig. 3. The two genetically distinct sympatric
54
55 lineages of *P. littoralis* recovered in the phylogeny (Fig. 2) are fully consistent with
56
57
58
59
60

1
2
3 the two groups (blue and green) observed in both gene networks: they are separated
4
5 by a minimum of ten mutations in COI and six in the 16S (Fig. 3). The most
6
7 common haplotype in both genes (HCOI 1 and H16S 1) represents 51.3% (COI) and
8
9 74.7% (16S) of the mussels sampled from all localities in Iberia and France (Fig. 3
10
11 and Table 1). These haplotypes are connected to several low frequency haplotypes (in
12
13 both gene networks), which generates star-like genealogies, suggesting a possible past
14
15 range expansion. In the COI network and within Lineage 1 (blue) there is one
16
17 haplogroup, four mutations from the most common one, which includes four of the
18
19 five individuals sampled from the Rhône basin (HCOI 17 - 18). This haplogroup
20
21 corresponds to haplotype H16S 8, three mutations away from the most common
22
23 one (H16S 1), in the 16S network (Fig. 3). Furthermore, in the COI network, all the
24
25 Tunisian individuals (red - HCOI 23-26) are linked with a minimum of 6 mutations to
26
27 the ten Iberian and French individuals (green - HCOI 20-22). In the 16S network, this
28
29 evidence is only seen by H16S 12 (green) that is exclusive to the Iberian and French
30
31 individuals, while H16S 9-11 (red) corresponds to all Tunisian endemic haplotypes.
32
33
34

35
36 Pairwise Φ_{ST} comparisons between the major groups, i.e., Lineage 1, Lineage 2-
37
38 Iberia+France and Lineage 2- Tunisia, showed highly significant genetic differences
39
40 among them (Table 3); Moreover, results from AMOVA showed that differences
41
42 between Lineage 1 and Lineage 2 accounted for 84.65% of overall variation in *P.*
43
44 *littoralis*, whereas only 3.41% of total mitochondrial haplotype variation occurred
45
46 among populations/within regions, with all structured levels presenting highly
47
48 significant genetic differences (Table 4).
49

50
51 For the computation of population pairwise Φ_{ST} , sequence data were partitioned
52
53 according to the Lineage structure visualized in the networks of haplotypes and
54
55 phylogenetic trees, to assure that only genetically homogeneous populations were
56
57
58
59
60

1
2
3 compared. Non significant population structure was evident as the vast majority of the
4
5 Φ_{ST} values were not significantly greater than zero (Table 5). However, within Lineage
6
7 1 significant differentiation between the Rhône population and almost all the others
8
9 was depicted.

10
11 Tests of demographic history yielded significantly negative results for D (Tajima's)
12
13 and F_s (Fu's) statistics but only for Linage 1 COI haplotype partition (Table 2), thus
14
15 suggesting genuine rapid demographic expansion within this lineage. Moreover, the
16
17 mismatch analysis shown in Fig. 4, revealed an unimodal distribution of pairwise
18
19 nucleotide differences within Lineage 1 [Fig. 4(a)]; and even more typical 'smooth
20
21 peak-like' distribution when the two haplotypes only found in the Rhône basin
22
23 (HCOI 17-18 Fig. 4) were excluded (data not shown), further indicating recent
24
25 population expansions for Lineage 1. Regarding Lineage 2, the mismatch analysis
26
27 reveals a multimodal distribution [Fig. 4(b)], typical of stable population sizes and
28
29 consistent with multiple refugial populations.
30
31
32
33
34
35

36 DISCUSSION

37
38 This study describes for the first time the genetic diversity of *P. littoralis* across
39
40 most of its European range (possibly only a few populations from Greece are
41
42 missing), comparing it with available North African and Turkish samples. The
43
44 detailed analysis of the genetic variation of *P. littoralis* clearly defined two major
45
46 mtDNA lineages. COI divergence of the specimen from Turkey was above 4%, a
47
48 value higher than the divergence limit generally admitted for the species level for
49
50 European freshwater mussels (e.g. Khalloufi *et al.*, 2011; Prié & Puillandre, in
51
52 press). Moreover, Turkish *Potomida* populations are clearly isolated from the
53
54 continuous distribution of *P. littoralis* in western Europe and North Africa, which
55
56
57
58
59
60

1
2
3 gives a strong indication of the existence of two different species ; i.e., *P. littoralis*
4 inhabiting North Africa, Iberia and France, and another species in Turkey.
5 Therefore and following Falkner *et al.*, (2002) the name *P. semirugata* (Lamarck,
6 1819) could be applied to this Turkish *Potomida* sp. haplotype for now. However, the
7 *Potomida* sp. occurring in the Middle East also needs further investigation. Indeed,
8 some caution must be taken and further research is needed as Kinzelbach (1987)
9 stated that two *P. littoralis* subspecies exist in the Orontes River in Turkey, i.e. *P. l.*
10 *semirugata* (Lamarck, 1819) and *P. l. delesserti* (Bourguignat, 1852).
11
12

13
14
15
16
17
18
19
20 Regarding the two well supported clades found within *P. littoralis*, Lineage 1 was
21 revealed to be very shallow. Furthermore, non significant population structure was
22 evident as the vast majority of the Φ_{ST} values were not significantly greater than zero,
23 with the exception of the Rhône population, the only geographically related
24 haplogroup depicted in this study. While this drainage was under sampled (only five
25 specimens altogether), only one specimen had the commonest haplotypes combination
26 (HCOI 1 / H16S 1). The occurrence of this isolated specimen in the Rhône could be
27 due to recent colonization via fish stocking or canals. In the Iberian Peninsula and in
28 France, many vertebrate, invertebrate and plant species show strong genetic
29 subdivisions, including amphibians (e.g. Alexandrino *et al.*, 2000; Gonçalves *et al.*,
30 2009), fishes (e.g. Mesquita *et al.*, 2005; Gante *et al.*, 2009; Keith *et al.*, 2011) and
31 invertebrates (e.g. Muñoz *et al.*, 2008; Ortego *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2010; Prié
32 *et al.*, 2012). Hence, it was somehow unexpected that *P. littoralis* does not share the
33 same pattern, especially because Iberian freshwater fishes often contain evolutionarily
34 distinct groups within each species, which has been interpreted as the existence of
35 multiple refugia during glacial cycles (e.g. Coelho *et al.*, 1998; Mesquita *et al.*, 2005;
36 Antunes *et al.*, 2006; Doadrio *et al.*, 2013). Moreover, in another unionoid,
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 *Anodonta anatina* (Linnaeus 1758), the results from a recent work carried out across
4
5 all the major Iberian Rivers also reveals the existence of distinct groups within the
6
7 Iberia, with COI uncorrected p -distances up to 3.5% among them (Froufe *et al.*,
8
9 unp.).

10
11 In this study, both COI and 16S genes generated star-like genealogies for Lineage 1,
12
13 suggesting a rapid past range expansion; this pattern was further supported by the
14
15 significant results of the neutrality tests of population growth, and unimodal
16
17 distribution of pairwise nucleotide differences depicted with the mismatch
18
19 analysis. All these results indicate recent population expansions within Lineage 1
20
21 while pointing to stable population sizes for the Lineage 2. As both Iberian and
22
23 French populations seem to share this pattern and despite the extensive sampling of
24
25 Iberian populations, it is not possible for now to establish the location of possible
26
27 refugia. While the results from this present study lack extensive sampling in France,
28
29 specimens from the Rhône seem to diverge from specimens sampled in the Atlantic
30
31 French drainages, which may correspond to the previously described Rhône
32
33 basin subspecies *P. littoralis cuneata* (Falkner *et al.*, 2002). Interestingly,
34
35 recent results obtained by Prié *et al.* (2012) for another unionoid, *Unio mancus*,
36
37 showed that specimens from the Rhône and Seine drainages in one hand and from
38
39 the Atlantic drainages on the other hand, clustered in two distinct supported clades,
40
41 suggesting that evolution units are based on a geographic pattern. Regrettably, *P.*
42
43 *littoralis* seems to be extirpated from the Seine drainage, which impair us of collecting
44
45 specimens from this basin and further discussion remains speculative. Further
46
47 sampling in French populations is needed to determine the extent of genetic structure
48
49 within the species in the area. Further sampling in Iberia will also be valuable in
50
51 order to clarify this absence of structure, especially in the southern Iberian rivers,
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 known for possessing strong genetic subdivisions in several taxa, including fishes
4 and freshwater mussels (e.g. Coelho *et al.*, 2005; Mesquita *et al.*, 2005; Antunes *et al.*,
5 2006; Froufe *et al.*, unp.).
6
7
8

9
10 On the other hand, the Strait of Gibraltar also played an important role in the
11 diversification of Iberian and North-African organisms; numerous studies carried out
12 in several taxa showed several patterns, including endemic lineages in northern Africa
13 distinct from the European ones (e.g. Paulo *et al.*, 2008 and references herein), a
14 genetic continuum from the Maghreb to Iberia that supports the idea of a non-
15 disjunct Atlantic–Mediterranean differentiation centre in this region (e.g. Schmitt *et*
16 *al.*, 2006; Carranza *et al.*, 2006) and a genetic link between the eastern Maghreb and
17 Italy (e.g. Cosson *et al.*, 2005), among others.
18
19
20

21
22 One of the most striking results of the present study was the finding of two
23 sympatric lineages (Lineage 1 and Lineage 2) in Northern Iberia (Douro) and the
24 Atlantic French River basins, with a mean COI genetic distance of 2.5% (Table 2):
25
26 In the sympatric populations of the Douro and Loire basins, each including ten
27 individuals, 60% of the individuals fall into Lineage 1 and 40% into Lineage 2.
28
29 Additionally, while the European haplotypes of Lineage 1 are 3.5% divergent from the
30 North African populations, the European haplotypes that cluster inside Lineage 2 are
31 only 1.8% apart from the North African ones. Several hypotheses can explain the
32 pattern observed. One likely explanation is the failure of this study in sampling
33 haplotypes that would fall inside Lineage 2, especially from the southern Iberian
34 populations. An alternative explanation could be that Lineage 2 might have existed
35 throughout the entire species distribution, followed by shrinking and fluctuating
36 population sizes, resulting in a loss of ancestral diversity *via* population bottlenecks
37 and drift. Host fish relationships for *P. littoralis* have not been firmly established, but
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 a preliminary study reveals potential hosts to be *Achondrostoma oligolepis*,
4
5 *Luciobarbus bocagei*, *Pseudochondrostoma duriense*, *Squalius alburnoides*, *Squalius*
6
7 *carolitertii* and *Salmo trutta fario* (Lopes-Lima unpub.). All but the last have
8
9 restricted Iberian distributions as well as limited dispersal capacity between basins.
10
11 However, as the European haplotypes of Lineage 2 seem to be only present in the
12
13 NW Atlantic basins, maybe *P. littoralis* colonized Iberia from North Africa using a
14
15 much more vagile host fish, with an Atlantic distribution, being *Salmo trutta* the
16
17 most plausible host. Further support to this explanation is given by the higher levels of
18
19 genetic variation in Northern Africa populations and in Lineage 2 in general,
20
21 compared to the widespread European Lineage 1 (Table 2); this in addition with the
22
23 COI genetic divergence between European haplotypes and Tunisian ones inside
24
25 Lineage 2 being small (1.8%; Table 2), makes this possible South-North expansion
26
27 to be relatively recent. Under this scenario, we would expect that North Africa was a
28
29 centre of origin of this species, and that Lineage 1 suffered severe shrinking and
30
31 fluctuating population sizes, being restricted to a small suitable area and from there
32
33 expanded again recently, as suggested by the shallow clade phylogeny, the star-like
34
35 genealogies, the tests of demographic history and the mismatch analysis.
36
37
38
39
40
41
42

43 **Taxonomy, conservation implications and future directions**

44
45
46
47 Studies on the distribution of freshwater mussels' genetic diversity in Europe are still
48
49 very scarce, including the distribution of genetic diversity in southern Europe (but see
50
51 Araujo *et al.*, 2009a; Araujo *et al.*, 2009b, for the Iberian *Unio* sp. and Geist & Kuehn,
52
53 2005; Bouza *et al.*, 2007 and Geist *et al.*, 2010 for *M. margaritifera*). Our study
54
55 considerably increases our understanding of the distribution of genetic diversity in *P.*
56
57
58
59
60

1
2
3 *littoralis* and has several direct consequences for the conservation of this species. As the
4
5 sole member of its genus, it is listed as near-threatened by IUCN- International Union for
6
7 Conservation of Nature (Cuttelod *et al.*, 2011) but it should be re-evaluated having in
8
9 mind recent surveys. We observed a lack of differentiation among populations, even
10
11 between major river drainages, together with low genetic and nucleotide diversities.
12
13 Additionally, very few populations contain the great majority of the genetic diversity,
14
15 i.e., the ones where the two sympatric mtDNA lineages are found, and unfortunately they
16
17 occupy a narrow and discontinuous geographical area. Thus, the risk of global reduction
18
19 in genetic diversity and extinction of its populations is high. Future research on genetic
20
21 connectivity in *P. littoralis* should aim at increasing sample sizes in studied sites and
22
23 adding additional sampling sites to achieve better fine-grained coverage of the remaining
24
25 extant populations of this species. In one hand, additional sampling would indicate
26
27 whether Lineage 2 is truly absent from most of the species range and thus confirm or
28
29 disprove the possible uniqueness of the Douro and French Atlantic populations; on the
30
31 other hand, wider sampling would confirm whether the local populations sampled for
32
33 this study are fully representative of these rivers. This aspect and the recent reports
34
35 showing significant declines in abundance and spatial distribution ranges (Pérez-
36
37 Quintero, 2007; Sousa *et al.*, 2008) makes this species highly vulnerable and more
38
39 conservation attention is needed. In this regard, different classes of molecular markers
40
41 provide different insights into the temporal and geographical scales of the life history of
42
43 a species and the recently developed microsatellites for this species (Froufe *et al.*, 2013)
44
45 will be the key methodology to reflect current gene flow. This methodology will be
46
47 fundamental to test if the two mitochondrial sympatric lineages are reproductively
48
49 isolated or not, and will also be valuable to estimate effective population sizes.
50
51 Additionally, fish host specificity studies would be valuable future tools to determine
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 whether biological differences exist between specimens belonging to the two sympatric
4
5 Lineages and necessary to develop comprehensive conservation efforts.
6

7 This study has delivered important contributions to our knowledge about the historical,
8
9 phylogenetic and phylogeographical processes of freshwater taxa post-glacial
10
11 colonization patterns in South-West Europe. Future research should seek to compare
12
13 these results with other freshwater mussel species inhabiting the same area, particularly
14
15 those with different ecological traits, i.e., with different modes of reproduction and in
16
17 different habitat types.
18
19

20 21 22 **ACKNOWLEDGMENTS**

23
24 Financial support was provided by Portuguese Foundation for Science and
25
26 Technology (FCT) project PTDC/AAC-AMB/117688/2010 and financial support of
27
28 Biotope; we were also partially supported by the European Regional Development
29
30 Fund (ERDF) through the COMPETE - Operational Competitiveness Programme
31
32 and national funds through FCT, under the project "PEst-C/MAR/LA0015/2011". We
33
34 thank José María Irurita, José Miguel Barea Azcón, Keiko Nakamura, Pablo Redin and
35
36 Esther Penin for all their help during the Spanish field campaigns, Benjamin Adam,
37
38 Panier Cucherat, Quentin Molina and Laurent Philippe for their help in sampling
39
40 French specimens, and Dan Graf for providing us with the exact locations of
41
42 previously sequenced animals. Official capture and sampling licenses were issued by the
43
44 following agencies: 1) Junta de Castilla y León (Consejería de Fomento y Medio
45
46 Ambiente EP/CYL/331/2012, de 17 de Abril de 2012); 2) Junta de Andalucía
47
48 (Consejería de Medio Ambiente- SGYB/FOA/AFR/SFS, de 17 de Julio de 2012); 3)
49
50 Gobierno de Aragón (Dirección General de Conservación del Medio Natural-
51
52 136.071/2012 de 12 de julio de 2012).
53
54
55
56
57
58
59
60

BIOSKETCH

Elsa Froufe studies focus on conservation genetics and evolution; she has been researching the spatial patterns of biodiversity and biogeography of several taxa.

Author contributions: E.F. and M.L. conceived the study; V. P., C. S., A. T., R. S., S. V., M. L. collected the data. E.F. analyzed the data and led the writing; all authors contributed to and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

Alexandrino, J., Froufe, E., Arntzen, J.W. & Ferrand, N. (2000) Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibian: Urodela). *Molecular Ecology*, **9**, 771-781.

Antunes, A., Faria, R., Johnson, W.E., Guyomard, R. & Alexandrino, P. (2006) Life on the edge: the long-term persistence and contrasting spatial genetic structure of distinct brown trout life histories at their ecological limits. *Journal of Heredity*, **97**, 193-205.

Araujo, R., Toledo, C. & Machordom, A. (2009a) Redescription of *Unio gibbus* Spengler, 1793, a west palaeartic freshwater mussel with hookless glochidia. *Malacologia*, **51**, 131-141.

Araujo, R., Reis, J., Machordom, A., Toledo, C., Madeira, M.J., Gómez, I., Velasco, J.C., Morales, J., Barea, J.M., Ondina, P. & Ayala, I. (2009b) The naiades of the Iberian Peninsula. *Iberus*, **27**, 7-72.

Barea-Azcón, J.M., Ballesteros-Duperón, E. & Moreno, D. (2008) *Libro Rojo de los Invertebrados de Andalucía*. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla.

1
2
3 Barnhart, M.C., Haag, W.R. & Roston, W.N. (2008) Adaptations to host infection and
4 larval parasitism in Unionoida. *Journal of the North American Benthological Society*,
5 **27**, 370-394.
6
7

8
9 Bogan, A.E. (2008) Global diversity of freshwater mussels (Mollusc, Bivalvia) in
10 freshwater. *Hydrobiologia*, **595**, 139-147.
11
12

13
14 Bouchet, P., Falkner, G. & Seddon, M.B. (1999) List of protected land and freshwater
15 molluscs in the Bern convention and European Habitats Directive: are they relevant to
16 conservation? *Biological Conservation*, **90**, 21-31.
17
18

19
20
21 Bouza, C., Castro, J., Martínez, P., Amaro, R., Fernández, C., Ondina, P. & San Miguel,
22 E. (2007) Threatened freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. in NW
23 Spain: low and very structured genetic variation in southern peripheral populations
24 assessed using microsatellite markers. *Conservation Genetics*, **8**, 937-948.
25
26
27

28
29 Carranza, S., Harris, D.J., Arnold, E.N., Batista, V. & Gonzalez J.P. (2006)
30 Phylogeography of the lacertid lizard, *Psammotromus algirus*, in Iberia and across the
31 Strait of Gibraltar. *Journal of Biogeography*, **33**, 1279-1288.
32
33
34

35
36 Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate
37 gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657-1659.
38
39

40
41 Coelho, M.M., Bogutskaya, N.G., Rodrigues, J.A. & Collares-Pereira, M.J. (1998)
42 *Leuciscus torgalensis* and *L. aradensis*, two new cyprinids for Portuguese fresh waters.
43 *Journal of Fish Biology*, **52**, 937-950.
44
45

46
47 Coelho, M.M., Mesquita, N. & Collares-Pereira, M.J. (2005) *Chondrostoma almaçai*, a
48 new cyprinid species from the southwest of Portugal, Iberian Peninsula. *Folia*
49 *Zoologica*, **54**, 201-212.
50
51
52

53
54 Cosson, J.F., Hutterer, R., Libois, R., Sarà, M., Taberlet, P. & Vogel, P. (2005)
55 Phylogeographical footprints of the Strait of Gibraltar and quaternary climatic
56
57
58
59
60

1
2
3 fluctuations in the western Mediterranean: a case study with the greater white-toothed
4 shrew, *Crocidura russula* (Mammalia: Soricidae). *Molecular Ecology*, **14**, 1151-1162.

5
6
7 Cuttelod, A., Seddon, M. & Neubert, E. (2011) *European Red List of Non-marine*
8 *Molluscs*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.

9
10
11 Doadrio, I., Carmona, J.A. & Machordom, A. (2013) Haplotype diversity and
12 phylogenetic relationships among the Iberian barbels (*Barbus*, Cyprinidae) reveal two
13 evolutionary lineages. *Journal of Heredity*, **93**, 140-147.

14
15
16 Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs
17 to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology*
18 *Resources*, **10**, 564-567.

19
20
21 Falkner, G., Ripken, T.J. & Falkner, M. (2002) Mollusques continentaux de France.
22 Liste de référence annotée et bibliographie. *Patrimoines naturels* **52**, 350 pp.

23
24
25 Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap.
26 *Evolution*, **39**, 783-791.

27
28
29 Froufe, E., Sobral, C., Teixeira, A., Lopes, A., Sousa, R., Varandas, S. & Lopes-Lima,
30 M. (2013) Development and multiplexing of microsatellite loci for the near threatened
31 freshwater mussel *Potomida littoralis* (Cuvier, 1798) using 454 sequencing. *Aquatic*
32 *Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. doi: 10.1002/aqc.2335.

33
34
35 Gante, H.F., Micael, J., Oliva-Paterna, F.J., Doadrio, I., Dowling, T.E. & Alves, M.J.
36 (2009) Diversification within glacial refugia: tempo and mode of evolution of the
37 polytypic fish *Barbus sclateri*. *Molecular Ecology*, **18**, 3240-3255.

38
39
40 Geist, J. & Kuehn, R. (2005) Genetic diversity and differentiation of central European
41 freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) populations: implications for
42 conservation and management. *Molecular Ecology*, **14**, 425-439.

43
44
45 Geist, J., Söderberg, H., Karlberg, A. & Kuehn, R. (2010) Drainage-independent genetic
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 structure and high genetic diversity of endangered freshwater pearl mussels
4 (*Margaritifera margaritifera*) in northern Europe. *Conservation Genetics*, **11**, 1339-
5 1350.
6
7

8
9 Gonçaves, H., Martínez-Solano, I., Pereira, R., Carvalho, B., García-París, M. &
10 Ferrand, N. (2009) High levels of population subdivision in a morphologically
11 conserved Mediterranean toad (*Alytes cisternasii*) result from recent, multiple refugia:
12 evidence from mtDNA, microsatellites and nuclear genealogies. *Molecular Ecology*, **18**,
13 5143-5160.
14
15

16
17 Graf, D.L. (2007) Palearctic freshwater mussel (Mollusca: Bivalvia: Unionoida)
18 diversity and the Comparatory Method as a species concept. *Proceedings of the*
19 *Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, **156**, 71-88.
20
21

22
23 Gum, B., Gross, R. & Kuehn, R. (2005) Mitochondrial and nuclear DNA
24 phylogeography of European grayling (*Thymallus thymallus*): evidence for secondary
25 contact zones in central Europe. *Molecular Ecology*, **14**, 1707-1725.
26
27

28
29 Hall, T.A. (1999) *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and*
30 *analysis*. Department of Microbiology, North Carolina State University.
31
32

33
34 Hänfling, B., Dümpelmann, C., Bogutskaya, N.G., Brandl, R. & Brändle, M. (2009)
35 Shallow phylogeographic structuring of *Vimba vimba* across Europe suggests two
36 distinct refugia during the last glaciation. *Journal of Fish Biology*, **75**, 2269-2286.
37
38

39
40 Keith, P., Persat, H., Feunteun, E. & Allardy, J. (2011) *Les poissons d'eau douce de*
41 *France*. Biotope-Mèze and MNHN-Paris. 552 pp.
42
43

44
45 Khalloufi, N., Toledo, C., Machordom, A., Boumaïza, M. & Araújo, R. (2011) The
46 unionids of Tunisia: Taxonomy and phylogenetic relationships, with redescription of
47 *Unio ravoisieri* (Deshayes, 1847) and *U. durieui* (Deshayes, 1847). *Journal of*
48 *Molluscan Studies*, **77**, 103-115.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Kinzelbach, R. (1987) Faunal history of some freshwater invertebrates of the Northern
4 Levant (Mollusca, Crustacea). In: *Proceedings of the Symposium on the Fauna and*
5 *Zoogeography of the Middle East* (eds. Krupp, F., Schneider, W. & Kinzelbach, R.), pp.
6 41-61. Mainz 1985, Vol. 28. Beihefte TAVO A.

7
8
9
10
11 Kotlik, P. & Berrebi, P. (2001) Phylogeography of the barbel (*Barbus barbus*) assessed
12 by mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, **10**, 2177-2186.

13
14
15
16 Librado, P. & Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of
17 DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.

18
19
20
21 Mcivor, A.L. (2004) *Freshwater mussels as biofilters*. University of Cambridge,
22 Cambridge. 142 pp.

23
24
25
26
27
28
29
30 Mesquita, N., Hänfling, B., Carvalho, G.R. & Coelho, M.M. (2005) Phylogeography of
31 the cyprinid *Squalius aradensis* and implications for conservation of the endemic
32 freshwater fauna of southern Portugal. *Molecular Ecology*, **14**, 1939-1954.

33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43 Muñoz, J., Gómez, A., Green, A.J., Figuerola, J., Amat, F. & Rico, C. (2008)
44 Phylogeography and local endemism of the native Mediterranean brine shrimp *Artemia*
45 *salina* (Branchiopoda: Anostraca). *Molecular Ecology*, **17**, 3160-3177.

46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

1
2
3 populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. *Molecular Ecology*, **8**,
4
5 1387-1404.

6
7 Ortego, J., Bonal, R., Cordero, P.J. & Aparicio, J.M. (2009) Phylogeography of the
8
9 Iberian populations of *Mioscirtus wagneri* (Orthoptera: Acrididae), a specialized
10
11 grasshopper inhabiting highly fragmented hypersaline environments. *Biological Journal*
12
13 *of the Linnean Society*, **97**, 623-633.

14
15 Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., Mcmillan, W., Stick, L. & Grabowski, G. (2002)
16
17 *The simple fools guide to PCR*. Version 2, Honolulu, Hawaii.

18
19 Paulo, O.S., Pinheiro, J., Miraldo, A., Bruford, M.W., Jordan, W.C. & Nichols, R.A.
20
21 (2008) The role of vicariance vs. dispersal in shaping genetic patterns in ocellated lizard
22
23 species in the western Mediterranean. *Molecular Ecology*, **17**, 1535-1551.

24
25 Pérez-Quintero, J.C. (2007) Diversity, habitat use and conservation of freshwater
26
27 molluscs in the lower Guadiana River basin (SW Iberian Peninsula). *Aquatic*
28
29 *Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **17**, 485-501.

30
31 Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and*
32
33 *Evolution*, **25**, 1253-1256.

34
35 Posada, D. & Crandall, K.A. (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into
36
37 networks. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 37-45.

38
39 Prié, V., Puillandre, N. & Bouchet, P. (2012) Bad taxonomy can kill: molecular
40
41 reevaluation of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Unionidae) and its accepted
42
43 subspecies. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, **405**, 08.

44
45 Prié, V. & Puillandre, N. in press. Molecular phylogeny, taxonomy and distribution of
46
47 French *Unio* species (Bivalvia, Unionidae). *Hydrobiologia*.

48
49 Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2007) *Tracer v1.4*. available from
50
51 <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

1
2
3 Ramos-Onsins, S. E. & Rozas, J. (2002) Statistical properties of new neutrality tests
4 against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 2092-2100.

5
6
7 Ramírez-Soriano, A., Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., Calafell, F. & Navarro, A. (2008)
8
9 Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions,
10
11 contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*, **179**, 555–567.

12
13
14 Rogers, A.R. & Harpending, H.C. (1992) Population growth makes waves in the
15
16 distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552-
17
18 569.

19
20
21 Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference
22
23 under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572-1574.

24
25 Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory*
26
27 *manual*. Cold Spring Harbour Press, New York.

28
29
30 Schmitt, T., Hewitt, G.M. & Muller, P. (2006) Disjunct distributions during glacial and
31
32 interglacial periods in mountain butterflies: *Erebia epiphron* as an example. *Journal of*
33
34 *Evolutionary Biology*, **19**, 108-113.

35
36
37 Slatkin, M., & Hudson, R.R. (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA
38
39 sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, **129**, 555-562.

40
41
42 Sousa, P., Froufe, E., Alves, P.C. & Harris, D.J. (2010) Genetic diversity within
43
44 Scorpions of the genus *Buthus* from the Iberian Peninsula: mitochondrial DNA
45
46 sequence data indicate additional distinct cryptic lineages. *Journal of Arachnology*, **38**,
47
48 206-211.

49
50
51 Sousa, R., Dias, S., Guilhermino, L. & Antunes, C. (2008) Minho River tidal freshwater
52
53 wetlands: threats to faunal biodiversity. *Aquatic Biology*, **3**, 237-250.

54
55
56 Sousa, R., Freire, R., Rufino, M., Méndez, J., Gaspar, M., Antunes, C. (2007) Genetic
57
58 and shell morphological variability of the invasive bivalve *Corbicula fluminea* (Müller,
59
60

- 1774) in two Portuguese estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **74**, 166-174.
- Sousa, R., Varandas, S., Cortes, R., Teixeira, A., Lopes-Lima, M., Machado, J. (2012) Massive die-offs of freshwater bivalves as resource pulses. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, **48**, 105-112.
- Swofford, D.L. (2003) PAUP* ver 4.0.b10. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 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. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739.
- Vaughn, C. (2010) Biodiversity losses and ecosystem function in freshwaters: emerging conclusions and research directions. *Bioscience*, **60**, 25-35.
- Walker, J.M., Bogan, A.E., Bonfiglio, E.A., Campbell, D.C., Christian, A.D., Curole, J.P., Harris J.L., Wojtecki, R.J. & Hoeh, W.R. (2007) Primers for amplifying the hypervariable, male-transmitted COII-COI junction region in amblineine freshwater mussels (Bivalvia: Unionoidea: Ambleminae). *Molecular Ecology Notes*, **7**, 489-491.
- Walker, J.M., Curole, J.P., Wade, D.E., Chapman, E.G., Bogan, A.E., Watters, G.T. (2006) Taxonomic distribution and phylogenetic utility of gender-associated mitochondrial genomes in the Unionoidea (Bivalvia). *Malacologia*, **48**, 265-282.
- Whelan, N.V., Geneva, A.J. & Graf, D.L. (2011) Molecular phylogenetic analysis of tropical freshwater mussels (Mollusca: Bivalvia: Unionoidea) resolves the position of *Coelatura* and supports a monophyletic Unionidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **61**, 504-514.
- Zieritz, A., Hoffman, J.I., Amos, H.W. & Aldridge, D.C. (2010) Phenotypic plasticity and genetic isolation-by-distance in the freshwater mussel *Unio pictorum* (Mollusca:

1
2
3 Unionidae). *Evolutionary Ecology*, **24**, 923-938.
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Table 1. List of samples, species, collection sites and GenBank accession codes.

Code	Species	Population number	Population	River Basin	Country	Haplotype (COI)	Haplotype (16S)	Lineage	Genbank (COI)	Genbank (16S)	Reference
PL7	<i>Potomida littoralis</i>	p1	Felgar	Douro	Portugal	HCOI 4	H16S 1	1	----	----	This study
PL8	<i>Potomida littoralis</i>	p1	Felgar	Douro	Portugal	HCOI 21	H16S 12	2	----	----	This study
PL9	<i>Potomida littoralis</i>	p1	Felgar	Douro	Portugal	HCOI 20	H16S 12	2	----	----	This study
PL12	<i>Potomida littoralis</i>	p1	Felgar	Douro	Portugal	HCOI 19	H16S 1	1	----	----	This study
PL13	<i>Potomida littoralis</i>	p1	Felgar	Douro	Portugal	HCOI 20	H16S 12	2	----	----	This study
PL16	<i>Potomida littoralis</i>	p1	Felgar	Douro	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL25	<i>Potomida littoralis</i>	p1	Felgar	Douro	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL27	<i>Potomida littoralis</i>	p1	Felgar	Douro	Portugal	HCOI 20	H16S 12	2	----	----	This study
PL38	<i>Potomida littoralis</i>	p1	Felgar	Douro	Portugal	HCOI 19	H16S 1	1	----	----	This study
PL40	<i>Potomida littoralis</i>	p1	Felgar	Douro	Portugal	HCOI 13	H16S 1	1	----	----	This study
PL456	<i>Potomida littoralis</i>	P2	Vadocondes	Douro	Spain	HCOI 16	----	1	----	----	This study
PL457	<i>Potomida littoralis</i>	P2	Vadocondes	Douro	Spain	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL458	<i>Potomida littoralis</i>	P2	Vadocondes	Douro	Spain	HCOI 2	H16S 1	1	----	----	This study
PL459	<i>Potomida littoralis</i>	P2	Vadocondes	Douro	Spain	HCOI 2	H16S 5	1	----	----	This study
PL460	<i>Potomida littoralis</i>	P2	Vadocondes	Douro	Spain	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL290	<i>Potomida littoralis</i>	p3	Pereira	Mondego	Portugal	HCOI 11	H16S 1	1	----	----	This study
PL291	<i>Potomida littoralis</i>	p3	Pereira	Mondego	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL292	<i>Potomida littoralis</i>	p3	Pereira	Mondego	Portugal	HCOI 7	H16S 1	1	----	----	This study
PL293	<i>Potomida littoralis</i>	p3	Pereira	Mondego	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL299	<i>Potomida littoralis</i>	p3	Pereira	Mondego	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL300	<i>Potomida littoralis</i>	p3	Pereira	Mondego	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL267	<i>Potomida littoralis</i>	p4	Abrantes	Tejo	Portugal	HCOI 9	H16S 1	1	----	----	This study
PL268	<i>Potomida littoralis</i>	p4	Abrantes	Tejo	Portugal	HCOI 10	H16S 3	1	----	----	This study
PL269	<i>Potomida littoralis</i>	p4	Abrantes	Tejo	Portugal	HCOI 8	H16S 1	1	----	----	This study

Code	Species	Population number	Population	River Basin	Country	Haplotype (COI)	Haplotype (16S)	Lineage	Genbank (COI)	Genbank (16S)	Reference
PL271	<i>Potomida littoralis</i>	p4	Abrantes	Tejo	Portugal	HCOI 1	H16S 7	1	----	----	This study
PL272	<i>Potomida littoralis</i>	p4	Abrantes	Tejo	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL275	<i>Potomida littoralis</i>	p4	Abrantes	Tejo	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL230	<i>Potomida littoralis</i>	p5	Saboia	Mira	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL231	<i>Potomida littoralis</i>	p5	Saboia	Mira	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL233	<i>Potomida littoralis</i>	p5	Saboia	Mira	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL234	<i>Potomida littoralis</i>	p5	Saboia	Mira	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL235	<i>Potomida littoralis</i>	p5	Saboia	Mira	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL240	<i>Potomida littoralis</i>	p5	Saboia	Mira	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL41	<i>Potomida littoralis</i>	p6	Sedas	Guadiana	Portugal	HCOI 5	H16S 1	1	----	----	This study
PL44	<i>Potomida littoralis</i>	p6	Sedas	Guadiana	Portugal	HCOI 14	H16S 1	1	----	----	This study
PL47	<i>Potomida littoralis</i>	p6	Sedas	Guadiana	Portugal	HCOI 3	H16S 1	1	----	----	This study
PL49	<i>Potomida littoralis</i>	p6	Sedas	Guadiana	Portugal	HCOI 3	H16S 1	1	----	----	This study
PL50	<i>Potomida littoralis</i>	p6	Sedas	Guadiana	Portugal	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL53	<i>Potomida littoralis</i>	p6	Sedas	Guadiana	Portugal	HCOI 1	H16S 6	1	----	----	This study
PL354	<i>Potomida littoralis</i>	p7	Alcolea del Rio	Guadalquivir	Spain	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL355	<i>Potomida littoralis</i>	p7	Alcolea del Rio	Guadalquivir	Spain	HCOI 12	H16S 1	1	----	----	This study
PL356	<i>Potomida littoralis</i>	p7	Alcolea del Rio	Guadalquivir	Spain	HCOI 12	H16S 4	1	----	----	This study
PL357	<i>Potomida littoralis</i>	p7	Alcolea del Rio	Guadalquivir	Spain	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL358	<i>Potomida littoralis</i>	p7	Alcolea del Rio	Guadalquivir	Spain	HCOI 2	H16S 1	1	----	----	This study
PL390	<i>Potomida littoralis</i>	p8	Benalup	Barbate	Spain	HCOI 6	H16S 1	1	----	----	This study
PL391	<i>Potomida littoralis</i>	p8	Benalup	Barbate	Spain	HCOI 12	H16S 1	1	----	----	This study
PL393	<i>Potomida littoralis</i>	p8	Benalup	Barbate	Spain	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL399	<i>Potomida littoralis</i>	p8	Benalup	Barbate	Spain	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study

Code	Species	Population number	Population	River Basin	Country	Haplotype (COI)	Haplotype (16S)	Lineage	Genbank (COI)	Genbank (16S)	Reference
PL400	<i>Potomida littoralis</i>	p8	Benalup	Barbate	Spain	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL319	<i>Potomida littoralis</i>	p9	Remolinos	Ebro	Spain	HCOI 2	H16S 1	1	----	----	This study
PL331	<i>Potomida littoralis</i>	p9	Remolinos	Ebro	Spain	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL346	<i>Potomida littoralis</i>	p9	Remolinos	Ebro	Spain	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL347	<i>Potomida littoralis</i>	p9	Remolinos	Ebro	Spain	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL350	<i>Potomida littoralis</i>	p9	Remolinos	Ebro	Spain	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL351	<i>Potomida littoralis</i>	p9	Remolinos	Ebro	Spain	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL486	<i>Potomida littoralis</i>	p10	Adour	Adour	France	HCOI 1	H16S 2	1	----	----	This study
PL487	<i>Potomida littoralis</i>	p10	Adour	Adour	France	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL488	<i>Potomida littoralis</i>	p10	Adour	Adour	France	HCOI 1	----	1	----	----	This study
PL489	<i>Potomida littoralis</i>	p10	Adour	Adour	France	HCOI 1	H16S 1		----	----	This study
PL490	<i>Potomida littoralis</i>	p10	Adour	Adour	France	HCOI 20	H16S 12	2	----	----	This study
Plit50	<i>Potomida littoralis</i>	p11	Ardèche	Rhône	France	HCOI 17	H16S 8	1	----	----	This study
Plit51	<i>Potomida littoralis</i>	p11	Ardèche	Rhône	France	HCOI 17	----	1	----	----	This study
Plit52	<i>Potomida littoralis</i>	p11	Ardèche	Rhône	France	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
Plit533	<i>Potomida littoralis</i>	p11	Camargue	Rhône	France	HCOI 17	H16S 8	1	----	----	This study
Plit64	<i>Potomida littoralis</i>	p12	Save	Garonne	France	----	H16S 12	1	----	----	This study
Plit65	<i>Potomida littoralis</i>	p12	Save	Garonne	France	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
Plit66	<i>Potomida littoralis</i>	p12	Save	Garonne	France	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
Plit138	<i>Potomida littoralis</i>	p13	Aveyron	Garonne	France	HCOI 22	H16S 12	2	----	----	This study
PL532	<i>Potomida littoralis</i>	p14	Vienne	Loire	France	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL535	<i>Potomida littoralis</i>	p14	Vienne	Loire	France	HCOI 22	H16S 12	2	----	----	This study
PL536	<i>Potomida littoralis</i>	p14	Vienne	Loire	France	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
PL542	<i>Potomida littoralis</i>	p14	Vienne	Loire	France	HCOI 20	H16S 12	2	----	----	This study
PL543	<i>Potomida littoralis</i>	p14	Vienne	Loire	France	HCOI 15	H16S 1	1	----	----	This study
PL544	<i>Potomida littoralis</i>	p14	Vienne	Loire	France	HCOI 22	H16S 12	2	----	----	This study

Code	Species	Population number	Population	River Basin	Country	Haplotype (COI)	Haplotype (16S)	Lineage	Genbank (COI)	Genbank (16S)	Reference
PL547	<i>Potomida littoralis</i>	p14	Vienne	Loire	France	HCOI 22	H16S 12	2	----	----	This study
Plit1	<i>Potomida littoralis</i>	p14	Vienne	Loire	France	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
Plit3	<i>Potomida littoralis</i>	p14	Vienne	Loire	France	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
Plit5	<i>Potomida littoralis</i>	p14	Vienne	Loire	France	HCOI 1	H16S 1	1	----	----	This study
----	<i>Potomida littoralis</i>	p15	Cirey-les-Belleaux	Rhône	France	HCOI 18	----	1	JN243905	----	Whelan <i>et al.</i> , 2011
----	<i>Potomida littoralis</i>	p16	----	Orontes	Turkey	----	----	-	JN243904	----	Whelan <i>et al.</i> 2011
----	<i>Potomida littoralis</i>	p17	----	Ziatine	Tunisia	HCOI 23	H16S 9	2	GU070946	GU070994	Khalloufi <i>et al.</i> 2011
----	<i>Potomida littoralis</i>	p17	----	Ziatine	Tunisia	HCOI 26	H16S 10	2	GU070949	GU070997	Khalloufi <i>et al.</i> 2011
----	<i>Potomida littoralis</i>	p18	----	El-Maâden	Tunisia	HCOI 25	H16S 10	2	GU070950	GU070998	Khalloufi <i>et al.</i> 2011
----	<i>Potomida littoralis</i>	p18	----	El-Maâden	Tunisia	HCOI 24	H16S 10	2	GU070952	GU071000	Khalloufi <i>et al.</i> 2011
----	<i>Potomida littoralis</i>	p19	----	Sejenane	Tunisia	HCOI 25	H16S 11	2	GU070953	GU071001	Khalloufi <i>et al.</i> 2011
----	<i>Potomida littoralis</i>	p19	----	Sejenane	Tunisia	HCOI 25	H16S 10	2	GU070954	GU071002	Khalloufi <i>et al.</i> 2011
----	<i>Unio mancus</i>	----	----	Loire	France	----	----		JX046694		Prié <i>et al.</i> , 2012
----	<i>Unio crassus</i>	----	----	Loire	France	----	----		JX046553		Prié <i>et al.</i> , 2012
----	<i>Lamprotula leai</i>	----	----	----	China	----	----		JF700192	----	Zhang <i>et al.</i> , (unpublished)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Table 2. Mean genetic divergence for the CO1 data set, between the main *Potomida littoralis* mitochondrial Lineages (Fig. 2); the number of base differences per site from averaging over all sequence pairs between Lineages are shown. Lineage 1 includes samples from all major Iberian and French Rivers; Lineage 2 corresponds to all the Tunisian specimens and also to 10 Iberian and French specimens. Number of individuals (n) and haplotypes (k), Haplotype diversity (H) ± SD and Nucleotide diversity (π) ± SD are also shown. Tests of population growth within *P. littoralis*, i.e., the results of Tajima’s D and Fu’s FS neutrality tests are also shown for each mitochondrial clade (Fig. 2). Statistically significant values are followed by an asterisk (p < 0.05).

	Lineage 1	Lineage 2 - Iberia+France	Lineage 2 - Tunisia	n	k	H	π	Fu’s FS	D
Lineage 1		0.006	0.007	67	18	0.623 ± 0.069	0.00203 ± 0.00038	-16.2751*	-2.24596*
Lineage 2 - Iberia+France	0.025		0.005	10	3	0.644 ± 0.101	0.00427 ± 0.00070	2.381	1.28389
Lineage 2 -Tunisia	0.035	0.018		6	4	0.800 ± 0.172	0.00415 ± 0.00118	-0.272	0.19651

Table 3. Genetic differentiation of *Potomida littoralis* (Φ_{ST}) among the major groups. Associated p-values were all highly significant ($p < 0.01$; probability that a random value obtained from 10,000 permutation is greater than observed value).

	Lineage 1	Lineage 2 - Iberia+France
Lineage 1		
Lineage 2 - Iberia+France	0.89669	
Lineage 2 -Tunisia	0.93048	0.77312

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) measured among populations of *Potomida littoralis* (see text for details).

Structure tested	Source of variation	% Variance	Fixation indices	<i>P</i>
	Among regions	84.65	0.84649	<0.001
Entire range	Among populations/ within regions	3.41	0.22209	<0.001
	Within populations	11.94	0.88058	<0.001

Peer Review

Table 5. Genetic differentiation among the populations of of *Potomida littoralis* (Φ_{ST}). Associated p-values were all non significant except for bold values with * ($p < 0.01$; probability that a random value obtained from 10,000 permutation is greater than observed value). Only populations with sample size ≥ 4 individuals were considered.

	Lineage 1											Lineage 2	
	Felgar	Vadocondes	Pereira	Abrantes	Saboia	Alcolea del Rio	Sedas	Benalup	Remolinos	Adour	Ardeche	Felgar	Vienne
Felgar												Felgar	
Vadacondes	0.10790											Vienne	0.88313
Pereira	0.05714	0.11528										Tunisia	0.81808* 0.81953
Abrantes	0.08889	0.12791	0.06667										
Saboia	0.08000	0.21053	-0.00000	0.10000									
Alcolea del Rio	0.10790	0.03846	0.11528	0.12791	0.21053								
Sedas	0.01600	0.12791	0.06667	0.10000	0.10000	0.12791							
Benalup	0.04184	0.08333	0.01081	0.05263	0.04000	-0.05769	0.05263						
Remolinos	0.06667	-0.03448	0.00000	0.08000	-0.00000	0.06764	0.08000	0.02185					
Adour	-0.00546	0.11111	-0.08108	0.01370	0.00000	0.11111	0.01370	-0.05263	-0.08108				
Ardeche	0.55007*	0.56140*	0.63871	0.58382*	0.73626*	0.59839*	0.58382	0.56731*	0.68439*	0.66667			
Vienne	0.12141	0.13734	0.14915	0.15593	0.15317	0.13734	0.15325	0.10281	0.15111	0.08258	0.31040*		

Figure legends:

Figure 1. Map showing the location of newly (n=78) and already available (n=8) sequence samples of *Potomida littoralis* from Portugal, France, Turkey and Tunisia. Population codes (P) follow Table 1.

Figure 2. Phylogenetic tree obtained by BI analysis of 86 COI sequences (590bp) of *Potomida littoralis* specimens with *Unio mancus*, *Unio crassus* and *Lamprotula leai* individuals as outgroups. Support values (%) are given as Bayesian posterior probability above nodes and Bootstrap support below nodes. The tree topologies resulting from ML and BI approaches were totally congruent.

Figure 3. COI and 16S Haplotype (TCS) networks showing the relationships of *Potomida littoralis* specimens, inferred from the same individuals sequenced (Table 1). Circle size is proportional to the observed haplotype frequencies and black points represent unobserved haplotypes and potential intermediates. Colours represent the geographic distribution of haplotypes as the phylogeny (Figure 2).

Figure 4. Pairwise mismatch distribution for *Potomida littoralis*. **A.** Samples from Iberia and France populations (Table 1), as corresponding to Lineage 1 in the phylogeny (Fig. 2); **B.** Samples from Iberia, France and Tunisia as corresponding to Lineage 2 in the phylogeny (Fig. 2). Solid lines indicate the observed frequency of pairwise mismatches between haplotypes within each region. Dashed lines represent the modelled frequency of expected pairwise differences.

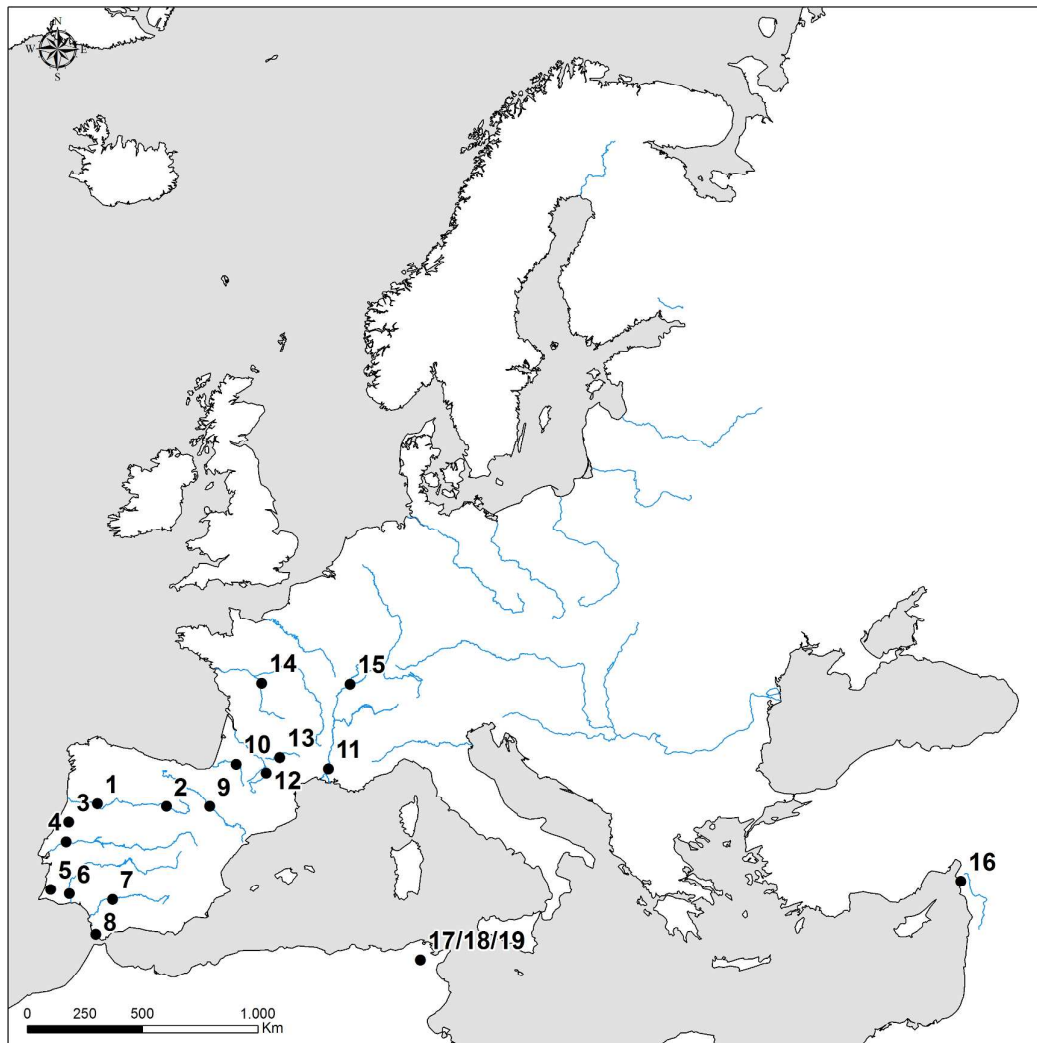


Figure 1.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

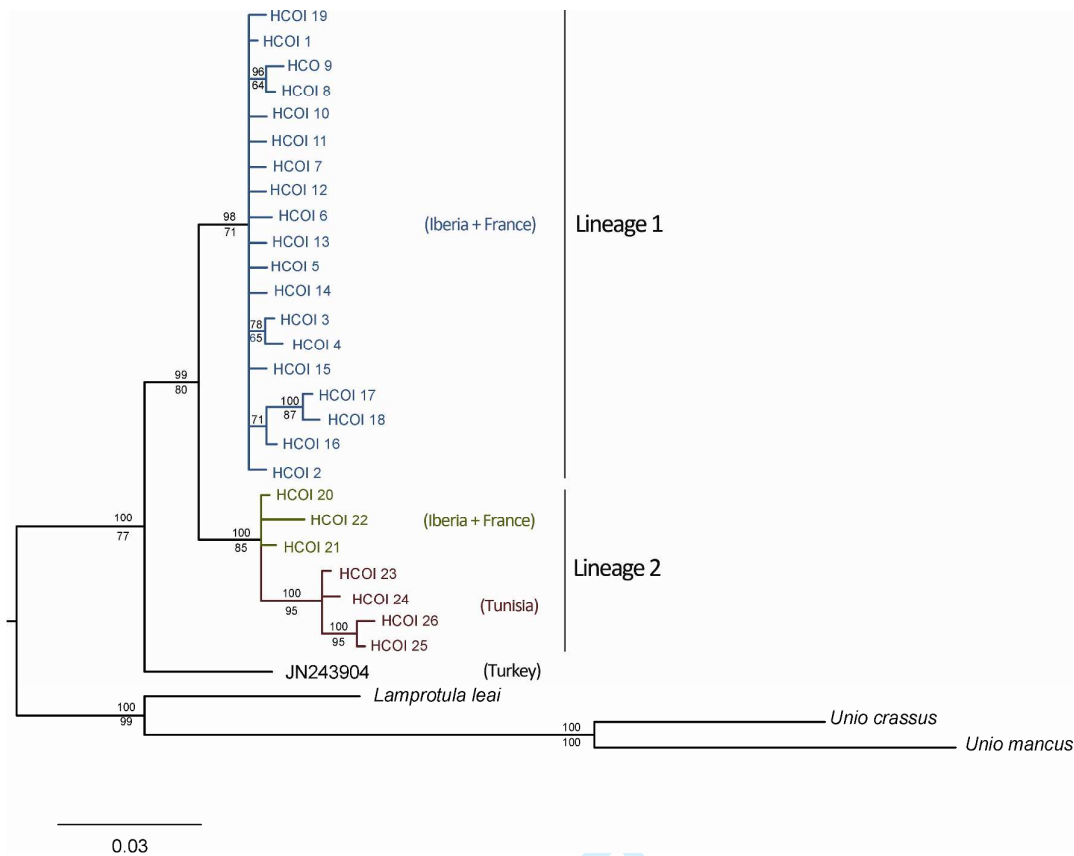


Figure 2.

Review

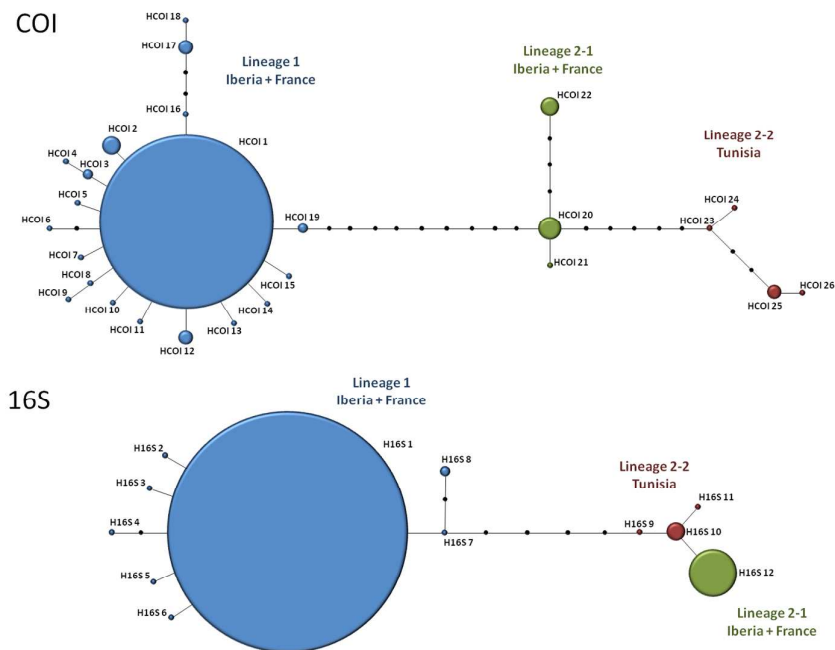


Figure 3.

Review

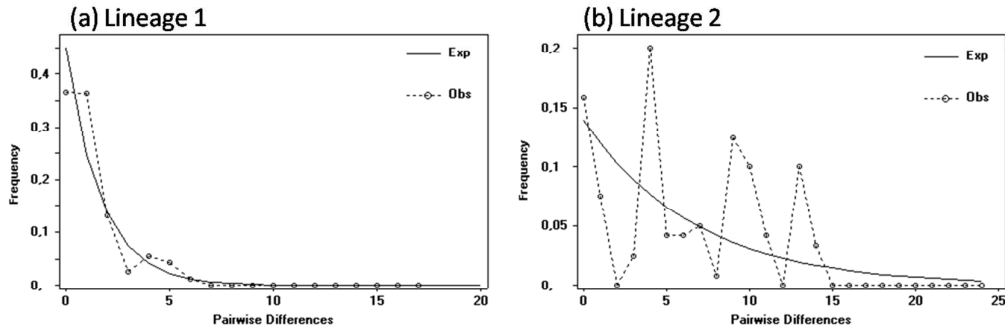


Figure 4.

For Peer Review

II.1.3 Structuration génétique chez les populations isolées de *M. margaritifera* en France

Dans la même optique, des échantillons correspondant biogéographiquement à la sous-espèce *Margaritifera margaritifera brunnea*, considérée par (Falkner *et al.* 2002) comme une unité évolutive géographiquement isolée et non comme un écotype⁸, ont été analysés à l'aide des gènes COI, 16S et ND1 (les ITS n'ont pas pu être amplifiés). Les séquences des gènes COI et 16S obtenues pour *M. auricularia* ont été également analysées pour tester la structuration génétique de l'espèce entre les bassins-versants. Les résultats montrent, comme le suggèrent (Machordom *et al.* 2003) et Geist (com. pers.) qu'il n'existe pas de structuration géographique chez *M. margaritifera*, à l'aire de répartition pourtant très fragmentée (Geist 2010). De la même manière, nous n'avons pas observé de divergence significative entre les différentes populations de *M. auricularia*, tous les spécimens séquencés présentant le même haplotype en COI, et un haplotype majoritaire en 16S, avec deux individus d'Espagne qui présentent un haplotype différent.

ARTICLE 5

Prié, V. *in prep.* Is the French freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera brunnea* (Bonhomme 1840) a taxonomic unit? Journal of Molluscan studies

⁸ " Les populations de moules perlières du Massif Central diffèrent des autres populations françaises par leur taille plus petite et leur coquille allongée et peu ventrue. La constance de ces caractères dans différents bassins hydrographiques suggère qu'il ne s'agit pas d'un simple écotype. "

Is the French freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera brunnea* (Bonhomme 1840) a taxonomic unit?

To be submitted to *Journal of Molluscan Studies*

VINCENT PRIÉ

Biotope – Service Recherche et Développement
22 Boulevard Maréchal Foch
34 140 Mèze

The freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus 1758) is largely distributed across Europe and North America but, living in crystalline headwaters, has a patchy distribution. It is the most charismatic and the most studied freshwater bivalve species in Europe, and benefits from disproportionate conservation measures (Prié, 2013). The occurrence of distinct evolutionary units within its patchy distribution could justify targeted conservation measures. The population of the Massif Central in France is considered by (Falkner, Ripken & Falkner, 2002) as a distinct endemic subspecies, *Margaritifera margaritifera brunnea* (Bonhomme 1840), assuming it represents a distinct evolutionary unit (Bouchet, 2002; Davis, 2004). Molecular tools allow testing such hypothesis. Machordom *et al.* (2003) have studied COI and 16S genes of *Margaritifera margaritifera* specimens from Spain, Ireland, Russia and North America. They observed two close mitochondrial lineages and suggested it could result from ancient polymorphism retention rather than biogeographic isolation. The subspecies *M. m. durovensis* Philips, 1928, which has sometimes been considered as a distinct species (Moorkens & Costello, 1994) is not supported by their phylogeny, which confirms the results already obtained by Chesney, Oliver & Davis (1993). No specimen attributable to *M. m. brunnea* was included in Machordom *et al.*'s study, nor any specimen of the isolated Pyrenean populations (Fig. 1).

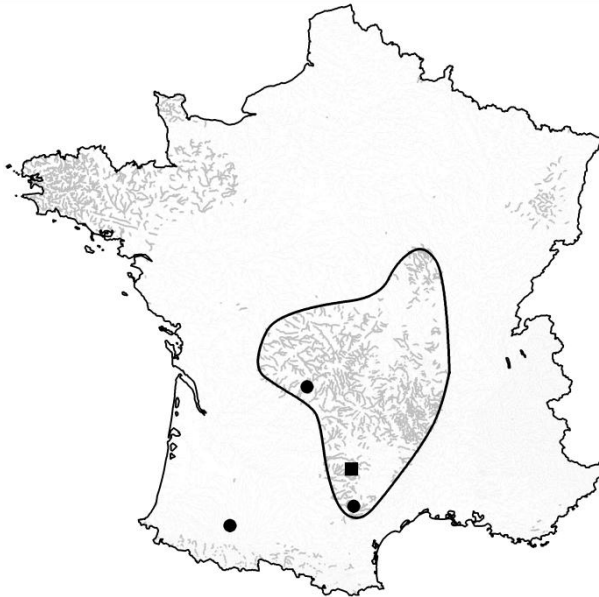


Figure 1: French population sampling sites. Grey lines: *M. margaritifera* species distribution model (Prié *et al.* 2013); dark line: putative range extension of *M. m. brunnea*; dots: sampled sites; square: type locality of *M. m. brunnea*.

I have performed molecular analyses on fourteen specimens belonging to three populations: nine specimens from two populations from the Massif Central (area of occurrence of *M. m. brunnea*, Fig. 1) and five specimens from an isolated population in the Pyrenees Mountains in France. COI, 16S and ND1 genes were amplified by Genoscreen company following the standard protocols (Prié & Puillandre, 2013; Serb, Buhay & Lydeard, 2003); ITS could not be amplified with universal primers. The 42 sequences available for *M. margaritifera* were downloaded from GenBank (see Table 1). *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) and *M. falcata* (Gould 1850) were used as outgroup; *Ambelam plicata* (Say, 1817) and *Amblema ellioti* Lea, 1856 (Unionoidea : Unionidae) were used as distant outgroups. Sequences were aligned

by eye and Bayesian, Maximum Likelihood and Maximum Parsimony analyses were run on the COI different haplotypes following the standard protocols (eg. Prié & Puillandre, 2013).

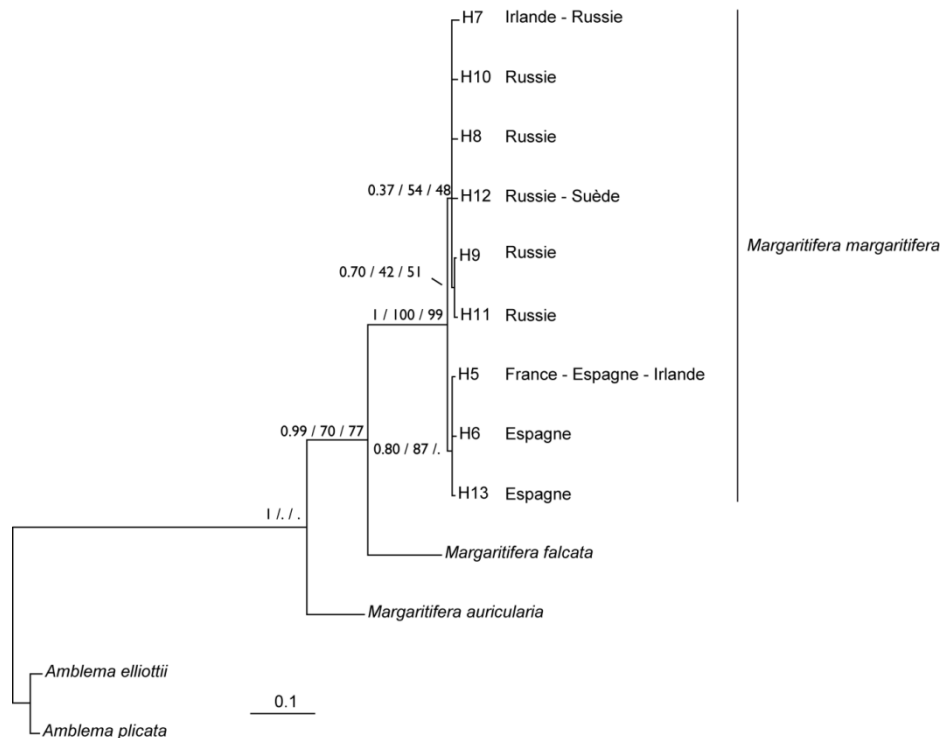


Figure 2: phylogenetic tree obtained for the COI gene with the available sequences and the newly sequenced specimens from France (haplotype H5). Node support is indicated as follows: posterior probability / bootstrap value (Maximum Parsimony) / bootstrap value (Maximum Likelihood). Scale: 10% divergence.

With regard to the COI gene, the 45 sequences were divided into nine haplotypes. All the specimens newly sequenced from France had the same haplotype, which is the most widespread (Table 1). The phylogenies obtained were congruent to that of Machordom, *et al.* (2003), with the Irish-Russian clade being poorly supported (Fig. 2). There are only two haplotypes of the 16S gene for the 36 sequences analyzed, one of which is known from a single specimen (FW1409.5) and differs by one mutation only (G=>A in position 423), which could be due to a sequencing error. Specimens from France were not different from other European specimens according to 16S gene. In regard to ND1, all but one specimen (specimen number 477; G=>C in position 185) had the same haplotype, while the two specimens from North America had a distinct haplotype (three mutations). No other specimen is available from Europe for this gene.

Table I. Samples list

	Taxon	Locality	Voucher number	COI	COI haplo-type	I6S	NDI	References	
Outgroups	<i>A. elliotii</i>	Outgroups	UAUC2511				AY655086	Campbell et al. 2005	
				AY654991	H1				
	<i>A. plicata</i>		photo Aplil	GU085282	H2		GU085337	Boyer et al. 2011	
	<i>M. falcata</i>				NC_015476	H3	U72548	NC_015476	Lydeard et al. 1996
					HM856634	H3	HM856634	HM856634	
<i>M. auricularia</i>		91	In progress	H4	In progress		Breton et al. 2011		
Ingroup	<i>M. margaritifera</i>	Ulla Basin (Pontevedra, Spain)	FW1194.1				AF303281	Machordom et al. 2003	
			FW1194-3	AF303316	H5	??			
		Tambre River (La Coruña, Spain)	FW1199.1	AF303317	H5	AF303283			
			FW1199-2	AF303318	H5	??			
		Mandeo River (La Coruña, Spain)	FW1200.2	AF303319	H5	AF303285			
			FW1201-1	AF303320	H5				
		Landro River (Lugo, Spain)	FW1296.16	AF303321	H6	AF303287			
			FW1296.21	AF303322	H6	AF303288			
		Tera River (Zamora, Spain)	FW1402.3	AF303325	H5	AF303289			
			FW1402-1	AF303323	H5				
		Narcea River (Asturias, Spain)	FW1402-2	AF303324	H5				
			FW1405.1	AF303326	H6	AF303290			
			FW1405.2	AF303327	H5	AF303291			
			FW1405.4			AF303292			
			FW1405-1	AF303329	H5				
		Dereen River (Carlow, Ireland)	FW1405-3	AF303328	H5				
			FW1405-5	AF303330	H13				
			FW1407.1			AF303293			
		Thurma River (Kola, Russia)	FW1407.2	AF303331	H7	AF303294			
			FW1407-4	AF303332	H7				
		Pana River (Kola, Russia)	FW1408.1			AF303295			
			FW1408.3	AF303334	H9	AF303296			
		Varzuga River (Kola, Russia)	FW1408-2	AF303333	H8				
			FW1409.5	AF303336	H11	AF303297			
			FW1409-4	AF303335	H10				
		Sweden: Gnyltan river	FW1409-6	AF303337	H10				
			FW1411.4	AF303338	H7	AF303298			
			FW1411.5	AF303339	H12	AF303299			
			FW1411.6	AF303340	H7	AF303300			
		Maine, USA	FW1412	AF303341	H11				
			MCZ DNA100694	AY579129	H9	AY579088			
		USA ?	MCZ DNA100697	AY579130	H9	AY579087			
			NRM 37489	DQ060171	H12	DQ060167			
<i>M. m. durovensis</i>	Adour River (France)	S.C. Kneeland (UMO)	DSMM05			EF446105	Kneeland & Rhymer 2007		
		USA ?	?			HM849252			
		Nore River (Kilkenny, Ireland)	FW1490.1	AF303342	H5	AF303301			
			FW1490.2	AF303343	H5	AF303302			
			FW1490.3	AF303344	H5	AF303303			
			FW1490.4	AF303345	H5	AF303304			
FW1490.5	AF303346		H5	AF303305					
FW1490.6	AF303347	H5	AF303306						
<i>M. m. brunnea</i>	Arn River (France)	No voucher	In progress	H5	In progress	In progress	This note		
		No voucher	In progress	H5	In progress	In progress			
		No voucher	In progress	H5	In progress	In progress			
		No voucher	In progress	H5	In progress	In progress			
		No voucher	In progress	H5	In progress	In progress			
		No voucher	In progress	H5	In progress	In progress			
	Corrèze River (France)	No voucher	In progress	H5	In progress	In progress			
		No voucher	In progress	H5	In progress	In progress			
		No voucher	In progress	H5	In progress	In progress			
		No voucher	In progress	H5	In progress	In progress			
		No voucher	In progress	H5	In progress	In progress			
		No voucher	In progress	H5	In progress	In progress			

In his critic to the checklists, Davis (2004) recalls the subspecies definition according to the Biological Species Concept (BSC): "*allopatric populations that have diverged sufficiently genetically (based on real genetic data) where they would be elevated to full species were it not for the complete sameness of the mate recognition system and the full capacity to produce a F1 and F2 generation if given the opportunity*". The geographic isolation of the French population is not a consequence of rarefaction but is rather linked to environmental conditions (see species distribution model in Fig. 2, Prié, Molina & Gamboa, 2013), noticeably geology, as *M. margaritifera* lives almost only on silicate rocks and avoid limestone. Because they have been presumably isolated for a long time, allopatric populations could have diverged sufficiently genetically to be considered as subspecies. However, our results show that these populations share the same genetic material as most European populations in regard to the markers that are commonly used to distinguish species and subspecies. More variable markers such as microsatellites can highlight a genetic structure at the population level, and these genetic pools are indeed worth conservation efforts (Geist, 2010; Geist & Kuehn, 2005). However, these observations should not have taxonomic implication: according to the BSC, the genetic divergences expected for the subspecific level should be comparable to those of the species level (Davis, 2004). Taxonomic and population scales should not be mixed.

Conservation is a recurrent argument for maintaining or creating species and subspecies. Some authors argue that it is difficult to convince managers or politicians of the need of protection of an unnamed form or population (Falkner, Bank & Von Proschwitz, 2001).

There has been a lot of discussions about the resulting taxonomic inflation (Isaac, Mallet & Mace, 2004) and its consequences in terms of conservation (ex. Harris & Froufe, 2005; Knapp, Ludhadha & Paton, 2005; Morrison *et al.* 2009; Padial & Ibáñez, 2005; Pillon & Chase, 2006). But taxonomy should be rooted in a realism framework: naming species or evolutionary units that are believe to be real. Deontologically, taxonomists should name evolutionary units that they can distinguish with the available biological tools, and reject the "Geopolitical Species Concept" (Karl & Bowen, 1999).

More pragmatically, taxonomic inflation increases the length of threatened species lists, with the risk of making them non-operational. Decision-makers and managers will pay attention to the few species they know, and will not retain a plethora of names. There are already many taxa in the French list of threatened or protected species that receive no attention at all, most efforts being targeted to the most charismatic species. Moreover, in practice the subspecies are largely ignored by conservationists. Even though *M. margaritifera* is the most privileged bivalve species for conservation measures in Europe, no particular effort has been directed towards *M. m. brunnea* since Falkner *et al.* (2002), when the name was re-established. Amongst the seven subspecies recognized within *Unio mancus* Lamarck, 1819 by the 2002 French checklist (Falkner, *et al.* 2002) - some of which being range restricted, declining or event likely extirpated (Prié, Puillandre & Bouchet, 2012) - none has received any conservation measure. Conservation mechanisms do not seem to depend on names. On the contrary, the most widespread European freshwater bivalves receive the lion's share of conservation funds, probably because they gather more people and benefit from more intensive lobbying (Prié, 2013).

The populations of *M. margaritifera* studied here do not diverge genetically to a point they could be considered as subspecies. Maintaining subspecies for the sake of conservation is not an argument. I therefore suggest invalidating the subspecies *M. m. brunnea*.

Acknowledgments

Autoroutes du Sud de la France (PIs: Daniel Blangy & Patrick Lebrun), Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement Languedoc-Roussillon (PI : Vallentin LeTellier) and Biotope have funded this study. Charlie Pichon and Nicolas Legrand took part in the sampling.

References

BOUCHET, P. 2002 Mollusques terrestres et aquatiques de France: un nouveau référentiel taxonomique, un nouveau départ, de nouvelles perspectives. In: *Mollusques continentaux de France. Liste de référence annotée et bibliographie.*, Vol. 52: *Patrimoines Naturels* (Falkner, G., Ripken, T.E.J. and Falkner, M., eds), pp. 5-20. MNHN, Paris.

- CHESNEY, H.C.G., OLIVER, P.G. & DAVIS, G.M. 1993 *Margaritifera durrovensis* Phillips, 1928: taxonomic status, ecology and conservation. *Journal of Conchology*, **34**: 267-299.
- DAVIS, G.M. 2004 Species check-lists: death or revival of the Nouvelle Ecole? *Malacologia*, **46**: 227-231.
- FALKNER, G., BANK, R.A. & VON PROSCHWITZ, T. 2001 Check-list of the non-marine Molluscan Species-group taxa of the State of Northern, Atlantic and Central Europe (CLECOM I). *Heldia*, **4**: 1-76.
- FALKNER, G., RIPKEN, T.E.J. & FALKNER, M. 2002 Mollusques continentaux de la France. Liste de référence annotée et bibliographie. *Patrimoine Naturels*, **52**: 1-350.
- GEIST, J. 2010 Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of Conservation Genetics and Ecology. *Hydrobiologia*, **644**: 69-88.
- GEIST, J. & KUEHN, R. 2005 Genetic diversity and differentiation of central European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) populations: implications for conservation and management. *Molecular Ecology*, **14**: 425-439.
- HARRIS, D. & FROUFE, E. 2005 Taxonomic inflation: species concept or historical geopolitical bias? *Trends in Ecology and Evolution*, **20**: 6.
- ISAAC, N.J.B., MALLET, J. & MACE, G.M. 2004 Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**: 464-469.
- KARL, S. & BOWEN, B. 1999 Evolutionary significant units versus geopolitical taxonomy: molecular systematics of an endangered sea turtle (genus *Chelonia*). *Conservation Biology*, **13**: 990-999.
- KNAPP, S., LUDHADHA, E. & PATON, A. 2005 Taxonomic inflation, species concepts and global species lists. *Trends in Ecology and Evolution*, **20**: 7.
- MACHORDOM, A., ARAUJO, R., ERPENBECK, D. & RAMOS, M.A. 2003 Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionoidea). *Biological Journal of the Linnean Society*, **78**: 235-252.
- MOORKENS, E.A. & COSTELLO, M.J. 1994 Imminent extinction of the Nore freshwater pearl mussel *Margaritifera durrovensis* Phillips: A species unique to Ireland. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **4**: 363-365.
- MORRISON, W.R., LOHR, J.L., DUCHEN, P., WILCHES, R., TRUJILLO, D., MAIR, M. & RENNER, S.S. 2009 The impact of taxonomic change on conservation: Does it kill, can it save, or is it just irrelevant? *Biological conservation*, **142**: 3201-3206.
- PADIAL, J.M. & IBÁÑEZ, C. 2005 New records and comments for the Mauritanian mammal fauna. *Mammalia*, **69**: 239-245.
- PILLON, Y. & CHASE, M.W. 2006 Taxonomic Exaggeration and Its Effects on Orchid Conservation. *Conservation Biology*, **21**: 263-265.
- PRIÉ, V. 2013 Flagships and Umbrellas: unbalanced conservation effort towards charismatic species as potential threat to the unknown. *Tentacle*, **21**: 32-34.
- PRIÉ, V., MOLINA, Q. & GAMBOA, B. 2013 French Naiad (Bivalvia: Margaritiferidae, Unionidae) Species Distribution Models: prediction maps as tools for conservation. *Hydrobiologia*.
- PRIÉ, V. & PUILLANDRE, N. 2013 Molecular phylogeny, taxonomy and distribution of French *Unio* species (Bivalvia, Unionidae). *Hydrobiologia*.
- PRIÉ, V., PUILLANDRE, N. & BOUCHET, P. 2012 Bad taxonomy can kill: molecular reevaluation of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Unionidae) and its accepted subspecies. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, **405**: 18.
- SERB, J.M., BUHAY, J.E. & LYDEARD, C. 2003 Molecular systematics of the North American freshwater bivalve genus *Quadrula* (Unionidae: Ambleminae) based on mitochondrial ND1 sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **28**: 1-11.

II.1.4 Structuration génétique du genre *Unio* en Europe (COI, 16S, 28S)

L'approche moléculaire testée sur *U. mancus* et *U. pictorum* avec le gène COI a ensuite été étendue à l'ensemble des *Unio* de France, en augmentant les caractères moléculaires par l'ajout des gènes 16S et 28S.

Le schéma conceptuel a été inversé : nous sommes partis de toutes les données moléculaires disponibles à l'échelle de l'Europe, y avons ajouté les 273 spécimens collectés de manière opportuniste en France indépendamment des hypothèses évolutives en cours, et avons a posteriori assigné les noms disponibles aux différents clades observés. Nous avons appliqué des noms aux clades observés en suivant la littérature et les préceptes du Code de nomenclature. Le rang taxonomique applicable à ces différents clades a été discuté sur la base du barcoding gap, qui a été observé sur l'ensemble des séquences d'*Unio* disponibles à l'échelle de l'Europe.

Les résultats des analyses génétiques gène par gène sont congruents, même si le 28S n'est pas assez variable pour fournir des résultats exploitables à l'échelle de l'espèce (plusieurs haplotypes sont partagés par des espèces différentes). La classification obtenue par les gènes mitochondriaux est globalement en accord avec la systématique actuelle au niveau spécifique. Les critères morphologiques utilisés actuellement pour la détermination des espèces s'appliquent bien pour la plupart des spécimens collectés. En revanche, plusieurs populations atypiques n'ont pu être reclassées : les populations des lacs (*U. cf. brindosianus*, *U. cf. bourgeticus*, *U. mancus* de l'étang de Beaufort en Bretagne, *U. m. requienii* de l'étang de la Gravière en Camargue), les topotypes ou "proxies" de certaines sous-espèces morphologiquement distinctes (*U. m. aleronii*, *U. m. moquinianus*, *U. m. turtonii*, *U. p. brindosianus*).

Les clades observés pour les trois sous-espèces d'*U. mancus* sont confirmés et sont mieux soutenus par les analyses intégrant les trois gènes. Aucun niveau sous-spécifique n'est justifiée pour *U. pictorum* et *U. tumidus*. En revanche, deux clades bien soutenus sont observés au sein d'*U. crassus*.

La distribution des divergences entre les spécimens étudiés à l'échelle européenne pour le COI (barcoding gap) est clairement bi-modale. Deux hypothèses taxonomiques peuvent être défendues : selon l'une, l'ensemble des taxons valides actuellement en Europe ne constitueraient que 7 espèces. *U. pictorum*, *U. mancus*, *U. elongatulus*, *U. ravoisieri* et *U. delphinus* seraient conspécifiques (le nom *U. pictorum* étant le plus ancien applicable à cette espèce), avec 8 clades correspondant à autant de sous-espèces ; selon l'autre, les noms d'espèce actuels seraient conservés mais *U. c. courtillieri* devrait être élevée au rang d'espèce et deux nouvelles espèces devraient être nommées pour les clades distincts actuellement considérés comme appartenant à *U. gibbus* et *U. ravoisieri*.

Plusieurs sous-espèces actuellement valides sont mise en question par les résultats obtenus. La question de savoir si l'échantillonnage correspond bien à des topotypes reste ouverte, étant donné les changements environnementaux qui ont eu lieu depuis la description des taxons. Certains taxons n'ont pas été retrouvés sur la station type et aucun proxy (matériel morphologiquement similaire au matériel type et géographiquement proche de la station-type) n'a été collecté. Ces taxons restent des incertae sedis et pourraient être conservés au bénéfice du doute. Toutefois, nous considérons que l'état de l'art de la taxonomie doit s'appuyer sur les données de terrain disponibles et proposons d'une manière pragmatique de réduire la liste de référence des *Unio* de France à sept taxons : *U. m. mancus*, *U. m. requienii*, *U. m. turtonii*, *U. pictorum*, *U. c. crassus*, *U. c. courtillieri*, *U. tumidus*. Indépendamment du choix de l'une ou de l'autre des hypothèses taxonomiques (splitter ou lump), cette attitude est conservatrice puisque tous les clades observés sont désignés par des noms préexistants.

Le déclin des naïades est mis en évidence sur la base du ré-échantillonnage des stations-types (40% des stations historiques n'hébergent plus l'espèce concernée).

Cette approche s'appuie essentiellement sur les gènes mitochondriaux, puisque le gène nucléaire choisi (le 28S) n'apporte que peu d'information pour le niveau. Les ITS n'ont pas été intégrés en raison des difficultés d'obtention de séquences exploitables (faible taux d'amplification, souvent des séquences avec double pics, les ITS étant multicopies) et des difficultés d'alignement (certaines parties sont tellement variables que les choix d'alignement sont subjectifs et relèvent du parti pris). Or les gènes 16S et COI ne sont pas indépendants. Il manque donc à cette analyse l'ajout d'autres marqueurs indépendants, nucléaire, morphométrique ou écologique.

Concernant l'ajout d'un marqueur moléculaire, les ITS pourraient être retravaillés puisqu'ils ont montré leur efficacité (Kallersjö *et al.* 2005) en analysant des fragments plus courts et en redéfinissant des amorces pour amplifier les spécimens sur lesquels les amplifications ont échoué. La lignée mâle du COI peut

fournir un autre marqueur, indépendant des lignées mitochondriales femelle, et qui raconte l'histoire des mâles. Les quelques séquences d'ADNmt mâle obtenues ont été analysées (voir § II.1.5).

La morphométrie a été testée à l'échelle sous-spécifique et n'apporte pas d'information. La plasticité morphologique intra-spécifique est telle qu'elle dépasse les critères de détermination des espèces : les *Unio* des lacs se ressemblent plus entre eux qu'ils ne ressemblent aux formes typiques de chacune des espèces auxquelles ils appartiennent.

L'écologie des différentes espèces peut constituer un critère supplémentaire de délimitation. Ce critère est approché plus loin par la modélisation d'habitats.

ARTICLE 6

Prié, V. & Puillandre, N. 2013. Molecular phylogeny, taxonomy and distribution of French *Unio* species (Bivalvia, Unionidae). *Hydrobiologia* (SI Freshwater bivalves).

Molecular phylogeny, taxonomy, and distribution of French *Unio* species (Bivalvia, Unionidae)

Vincent Prié · Nicolas Puillandre

Received: 27 December 2012 / Accepted: 26 May 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract A plethora of unionid names was established in the nineteenth century by the “Nouvelle Ecole”. Although naiad morphological plasticity is well documented, the currently recognized fauna, with 17 species and subspecies included in the French checklist for the *Unio* genus, is still based upon morphological characters only. Insights have been provided from molecular data elsewhere in Europe and North Africa, but the French fauna remains unstudied. We present a molecular phylogeny of the *Unio* genus in France based on COI, 16S and 28S genes; taking up all available data in Europe plus 273 specimens collected in all main French drainages. The results show that

there are either three valid species in France, with *U. pictorum* and *U. mancus* synonymized, or five, with the subspecies *U. crassus courtillieri* elevated to species level. Subspecies were generally not recovered, which questions the evolutionary units tacitly implied by subspecific names. Although sampling topotypes is the most reliable way to evaluate the status of a nominal subspecies, major human-induced changes in aquatic hydrosystems challenge the method. Nevertheless, operational taxonomy has to rely on ground-truthed data and we propose to reduce the actual number of valid taxa in France to the seven observed operational taxonomic units.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10750-013-1571-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Keywords Freshwater mussels · Molecular systematic · Species delimitation · Barcoding gap · Conservation genetics

Guest editors: Manuel P. M. Lopes-Lima, Ronaldo G. Sousa, Simone G. P. Varandas, Elsa M. B. Froufe & Amílcar A. T. Teixeira / Biology and Conservation of Freshwater Bivalves

Introduction

V. Prié (✉) · N. Puillandre
Muséum National d'Histoire Naturelle, Département Systématique et Évolution, USM 603/UMR 7138 “Systématique, Adaptation, Évolution”, Équipe “Exploration de la Biodiversité”, Case Postale 51, 55 Rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France
e-mail: vprie@mnhn.fr

Many famous malacologists of the nineteenth and twentieth century have worked in France, and among them Bourguignat and Locard, who were leaders of the so-called “Nouvelle Ecole”, which ended up with a plethora of names: Locard (1893) reckoned as many as 900 freshwater bivalve species living in France alone. Germain (1931) drastically reduced the number of valid names for France to only 43 species, but conserved 85 subspecies, demonstrating the uncertainty in dealing with the various forms that occurred

V. Prié
Service Recherche et Développement, Biotope, BP 58, 22 Bd Maréchal Foch, 34140 Mèze, France

in French rivers. Later on, Haas (1969) revised the Unionidae family, clarifying the systematic and taxonomy of French naiads. If the system from Haas (1969) is largely used in the recent literature, it is derived from Haas (1940), and its system therefore pre-dates the widespread use of the Biological Species Concept. The entities that form the foundation of the modern system were thus not necessarily intended to be species in the modern sense. The current taxonomy is still based on Haas' work, but Falkner et al. (2002) made minor taxonomic changes and clarified the subspecies distributions in France. Gargominy et al. (2011) strictly followed Falkner et al. (2002) pending further studies.

Despite the fact that shell plasticity in unionoids is well documented (e.g., Ortmann, 1920; Agrell, 1948; Nagel, 1992; Watters, 1994; McMurray et al., 1999; Zieritz & Aldridge, 2009; Zieritz et al., 2010a, b), the current classification is still based on morphological characters only and, in the golden age of DNA sequencing, almost no molecular studies have been performed for French species (but see Nagel & Badino, 2001, for enzyme electrophoresis). Although the number of accepted species has dropped significantly since the work of Germain and Haas, the persistence of many subspecies in French checklists reflects unionid morphological variability. Are these "subspecies" morphotypes, resulting from adaptation to local conditions and not determined genetically, or phylotypes, i.e., lineages that evolve independently?

On one hand, considering the insularity context defined by the hydrological networks, gene flow could be limited by geographical barriers, leading to divergences between populations and potentially distinct evolutionary units. Indeed, in a previous study Prié et al. (2012) stressed that *U. mancus* is genetically structured in three subspecies, whose geographical distribution matches the main rivers coastal drainages. On the other hand, despite the important shell variability observed within *U. mancus* ssp. (Prié, 2012), only three subspecies were supported by molecular data out of seven previously recognized in the French checklist.

Freshwater mussel populations are currently enduring an alarming decline (Lydeard et al., 2004) and many historical populations have become extirpated. Type localities of nominal taxa often do not support *Unio* species anymore, and if they do, it is not certain that material collected nowadays belongs to the same gene

pool as the specimens occupying the type localities in the mid-nineteenth century, when the nominal species were established. Type material, when available, consists of shells only, unsuitable for genetic analyses.

The difficulties in reliably delimiting and identifying *Unio* species and subspecies therefore depend upon: (i) shell plasticity, (ii) lack of type material suitable for genetic analyzes, and (iii) extirpation of historical populations in type localities. Notwithstanding these difficulties, recent papers reported upon molecular-based phylogenies in Iberian Peninsula (Araujo et al., 2005, 2009b; Reis & Araujo, 2009), north Africa (Araujo et al., 2009a; Khalloufi et al., 2011), and northeast Europe (Källersjö et al., 2005; Soroka, 2010) and which proved to be efficient in clarifying the unionid taxonomy.

In this paper, we collected and sequenced the four recognized French *Unio* species, *U. pictorum* (Linnaeus, 1758), *U. mancus* Lamarck, 1819, *U. crassus* Philipsson, 1788 and *U. tumidus* Philipsson, 1788 from several localities. The studied material comes both from opportunistic sampling within all French main drainages, in the framework of impact studies, and systematic sampling of type localities. The validity of French species and subspecies of *Unio*, their hypothetical correspondence with main rivers drainages and their phylogenetic relationships are assessed in a global phylogeny that also includes published molecular data for European species.

Materials and methods

Taxon sampling

This study focuses on French species of the *Unio* genus with special consideration given to the accepted subspecies (see Table 1). Nowadays, accepted species and subspecies are based on French checklist established by Gargominy et al. (2011). Complete taxon sampling was problematic given the global decline in habitat quality and the degradation of type localities (see "Results" section). When topotypes could not be collected, we tried to sample specimens from the same drainage, with similar shell shape, hereafter called "proxies". Sampling effort was intensive, particularly in type localities, involving three to six experienced persons and scuba diving when necessary. A total of 272 specimens were collected from 81 localities

Table 1 Accepted French *Uitio* species and subspecies, distribution and proposed molecular revision under the splitter and lumpner partitions

French checklist (Gargominy et al., 2011)	Type locality	Population trend in type locality	Distribution (Falkner et al., 2002)	Studied material	Species delimitation, splitter partition [clades support values, BI/ML/MP]	Species delimitation, lumpner partition [clades support values, BI/ML/MP]
<i>U. m. mancus</i> Lamarck, 1819	France: Drée River	↘	Seine, Loire, Charente drainages and Normandie, absent from Brittany	Topotypes		
<i>U. m. aleronii</i> Companyo & Massot, 1845	France: Basse River	↘	Small Mediterranean drainages of the Pyrenees and Garonne drainage	Topotypes		
<i>U. m. moquinianus</i> Dupuy, 1843	France: Echez River	↓	Hautes-Pyrénées and Pyrénées-Atlantiques	Proxies : Loutz River		
<i>U. m. turtonii</i> Payraudeau, 1826	France: Prunelli River France: Taravu River	↓ →	Corsica, and (with doubt) south-east France	Topotypes	<i>U. mancus</i> [1.00/90/54]	<i>U. pictorum</i> [1.00/100/87]
<i>U. m. requienii</i> Michaud, 1831	France: Solenzarra River France: Travu River France: Tavignanu River	↘ ↓ →	Rhône drainage downstream the town of Lyon	Topotypes		
<i>U. m. brindosianus</i> De Folin & Berillon, 1874	France: Golo River France: Lakes near Arles	↘ →	Lakes from the Lande coast (south-west France)	Topotypes	<i>U. pictorum</i> [0.97/90/80]	
<i>U. p. pictorum</i> (Linnaeus, 1758)	European rivers	?	Rhine, Loire and Seine basins, including small basins from the Manche and the Northern Sea, but excluding the Massif Armoricain (= Brittany) basins	Proxies : Loire and Seine basins		

Table 1 continued

French checklist (Gargominy et al., 2011)	Type locality	Population trend in type locality	Distribution (Falkner et al., 2002)	Studied material	Species delimitation, splitter partition [clades support values, BI/ML/MP]	Species delimitation, lumpers partition [clades support values, BI/ML/MP]
<i>U. c. riparius</i> C. Pfeiffer, 1821	Germany: Kinzig River	↘	Rhine and Escaut basins, in France Vosges, Lorraine, Ardennes rivers.	Proxies : Rhine drainage (Canal Bruche Eckbolsheim)	<i>U. crassus</i> [0.99/79/78]	<i>U. crassus</i> Philipsson, 1788 [1.00/99/88]
<i>U. c. courtillieri</i> Hattemann, 1859	France: Ruisseau de Jarré	↓	Loire and Seine drainages	Proxies : Vienne River	<i>U. courtillieri</i> [1.00/95/96]	
<i>U. t. depressus</i> (Donovan, 1802)	UK: River Froome in Somersetshire		Rhine drainage and British islands	Proxies : Meuse River	<i>U. tumidus</i> [1.00/100/100]	<i>U. tumidus</i> [1.00/100/100]
<i>U. t. vinceleus</i> De Joannis, 1855	France: Verzée River	↓	Loire and Seine drainages	Proxies : Seine River		
<i>U. m. bourgeticus</i> Bourguignat, 1882	France: Lake Bourget	↘	Saône and Ain drainages, plus Bourget Lake	(1)		
<i>U. p. deshayesii</i> Michaud, 1831	France: Near Quimper	↓	Brittany	(1)		
<i>U. p. rostratus</i> Lamarck, 1819	France: Rhône River	↘	Saône and part of the Rhône River	Proxies : Ain River and Lake Bourget		
<i>U. p. platyrhynchoides</i> Dupuy, 1849	France: Lake Aureilhan and Lake Cazau	↓	Lakes of the Landes coast, from the Pyrenees to the Garonne estuary	No specimen could be collected in similar environment but the specimens from Lake Brindos	<i>Incertae sedis</i>	
<i>U. c. nanus</i> Lamarck, 1819	France: Franche-Comté Region	↘	Saône River plus isolated populations in Vaucluse and Bouches-du-Rhône départements	0		
<i>U. c. cytherea</i> Küster, 1836	Germany: Altmühl River in Bayern	?	Upstream Danube, Rhine and Rhône drainages	0		

Population trend in type locality: → presumably stable, ↘ declining, ↓ likely extirpated

(1) Material collected in type or surrounding locality did not correspond morphologically to type specimens

Population trend in type locality: → presumably stable, ↘ declining, ↓ likely extirpated

(1) Material collected in type or surrounding locality did not correspond morphologically to type specimens

(Online Resources 1, 2—Supplementary material). The main French coastal drainage basins were sampled opportunistically, mainly within the framework of environmental impact assessments and type localities of nine taxa were systematically sampled. All species distribution records are placed in the public INPN database (www.inpn.mnhn.fr).

Seven *Unio* species not found in France were included in the analyses: *Unio tumidiformis* Castro, 1885 and *Unio delphinus* Spengler, 1793 from Portugal; *Unio durieui* Deshayes, 1847 from Tunisia; *Unio ravoisieri* Deshayes, 1847 and *Unio gibbus* Spengler, 1793 from Spain and Tunisia; *Unio elongatulus* Pfeiffer, 1825 from Italy. For these species, COI and 16S sequences were downloaded from GenBank (see Online Resource 1—Supplementary material for localities and GenBank accession numbers). The 28S gene was not available for non-French species *U. gibbus*, *U. durieui*, *U. tumidiformis*, *U. elongatulus*, and *U. delphinus*, but it was amplified by ourselves for two specimens of *U. ravoisieri* from Spain.

These non-French species were used (i) to improve the intra and interspecific genetic diversity estimation within the *Unio* genus, since sister species of French naiads (with which minimum interspecific genetic distance are found) can potentially be found in other countries, and (ii) to assess the phylogenetic relationships of French *Unio* with other European taxa.

Species of different degrees of relatedness to the *Unio* genus were used as outgroups: *Pseudanodonta complanata* (Rossmässler, 1835), *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758), *A. cygnaea* (Linnaeus 1758) (Unionoidea: Unionidae: Unioninae: Anodontini); *Amblema plicata* (Say, 1817) (Unionoidea: Unionidae: Ambleminae); *Potomida littoralis* (Cuvier, 1798) (Unionoidea: Unionidae: *incertae sedis*). *Margaritifera auricularia* (Spengler 1793) (Unionoidea: Margaritiferidae) was used as distant outgroup to artificially root the tree.

DNA analysis

Sequencing

A piece of foot was clipped from living specimens and preserved in 90% ethanol. Soft tissues and shells are kept in the Muséum national d'Histoire naturelle in Paris (see Online Resource 1—Supplementary material for voucher numbers). DNA was extracted from these samples using the Nucleospin Tissue Kit

(marketed by Macherey–Nagel), following the manufacturer's protocol. Three partial gene sequences were amplified: a partial sequence of the cytochrome oxidase subunit I (COI) gene; a partial sequence of the rRNA 16S gene and a partial sequence of the rDNA 28S gene. Extractions, amplifications, and sequencing were performed by Genoscreen (France) and Eurofins (Germany). The COI gene was amplified by PCR using the primers and protocols described in Prié et al. (2012).

The 16S gene was amplified using the universal primers 16Sar and 16Sbr (Palumbi, 1996). The PCR mix contained 2 µl of DNA, 6.3 µl of MyTaq HS Mix, 2× (commercialized by Bioline), 0.075 µl of each primer (concentration 100 µM), and H₂O was added for a final volume of 12 µl (Eurofins protocol); or 2 µl of DNA, 0.2 µl of FastStart Taq DNA Polymerase (commercialized by Roche) and associated reagents, 0.5 µl of each primer (concentration 10 µM), 1.5 µl of MgCl₂, 0.6 µl of dNTP, 2.5 µl of buffer, and H₂O was added for a final volume of 25 µl (Genoscreen protocol). PCR started with an initial denaturation cycle at 95°C for 15 s, followed by 34 cycles of 95°C for 15 s, 53°C for 15 s, 72°C for 10 s, and a final extension at 72°C for 10 min (Eurofins protocol); or with an initial denaturation cycle at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 53°C for 30 s, 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min (Genoscreen protocol).

The 28S gene was amplified using the primers C1 and D3 (Jovelin & Justine, 2001). The PCR mix contained 3 µl of DNA, 0.3 µl of Gold Taq (commercialized by ABI), 2.5 µl of Gold Buffer (commercialized by Promega), 0.5 µl of each primer (concentration = 10 µM) and H₂O was added for a final volume of 25 µl (Eurofins protocol); or 2 µl of DNA, 0.2 µl of Taq, 0.5 µl of primers (concentration 10 µM), 1.5 µl of MgCl₂, 0.6 µl of dNTP, 2.5 µl of buffer and H₂O was added for a final volume of 25 µl (Genoscreen protocol). PCR started with an initial denaturation cycle at 95°C for 12 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were purified using ExoSAP-IT (commercialized by Affymetrix UK; Eurofins protocol) or NucleoFast 96 PCR (commercialized by Macherey–Nagel; Genoscreen protocol) and sequence reaction performed with BigDye (ABI).

GenBank accession numbers are provided in the Online Resource 1—Supplementary material.

Phylogenetic analysis

Sequences were automatically aligned using ClustalW multiple alignments implemented in BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). The accuracy of automatic alignments was confirmed by eye. Only a few gaps, unambiguously aligned, were inferred for the 28S and 16S genes: they were conserved for the analyses. MEGA 5.10 (Tamura et al., 2011) was used to calculate the p-distances (following Srivathsana & Meier, 2012) between each pair of specimens. Only one sequence per haplotype was included in the phylogenetic analyses. Identical sequences were identified using DNA Sequence Polymorphism© V 5.10.01 (Rozas & Rozas, 1999) and checked out both by MEGA 5.10 distance matrix and directly throughout sequences alignments. The final dataset included 66 unique haplotypes for COI, 60 for 16S, 11 for 28S, and 95 for the combined dataset (see “Results” section). Nucleotide substitution models were selected for each gene separately and for the combined dataset (COI + 16S + 28S—see below) using the program jModeltest 0.1.1 (Posada, 2008), based on the AIC criterion. Best models were TVM + I + G (with I = 0.5570 and G = 0.9540) for COI; TIM2 + G (with G = 0.2370) for 16S; GTR + G (with G = 0.1240) for 28S and TVM + G (with G = 0.1650) for the combined dataset. Saturation was tested for the three codon positions of the COI gene, and the third position was proved to be largely homoplastic (results not shown): we thus defined three partitions (one for each codon position) for the COI gene in all subsequent Maximum Likelihood (ML) and Bayesian analyses (BI). ML analyses have been performed using RAxML-HPC2 on XSEDE available on the Cipres Science Gateway (<http://www.phylo.org/portal2/>) (Miller et al., 2010), with 1,000 Bootstrap replicates. MP has been performed with MEGA 5.10 (parameters by default). BI analysis have been performed running two parallel analyses in MrBayes V 3.1.2 (Huelsenbeck et al., 2001), consisting each of two Markov chains of 10,000,000 generations each, sampled every 1,000 generations (28S gene), 15,000,000 generations sampled every 5,000 generation (COI and 16S gene), and 30,000,000 generations sampled every 5,000 generation for the combined dataset. For the combined dataset, each gene was treated as unlinked partitions and each codon position of the COI gene was treated as an independent partition. Convergence of the analysis

was checked using Tracer V 1.4.1 (Rambaut & Drummond, 2007); all ESS values were >200 (default burnin). A consensus tree was then calculated after omitting the first 10% trees as burn-in.

Results

Systematic sampling

Type localities were sampled for nine out of the 17 accepted taxa in France (Online Resource 2—Supplementary material).

Sampling was successful for type localities of *U. mancus mancus*, *U. m. aleronii*, *U. m. bourgeticus*, *U. m. brindosianus*, *U. m. requienii* and *U. m. turtonii* (Prié et al., 2012). *U. m. moquinianus* is thought to be extirpated from its type localities, but proxies were collected from the Adour drainage.

Type locality of *U. pictorum pictorum* (“*Barbariae, Tranquebariae and European freshwaters*”, Haas, 1969) is too vague for topotypes sampling. No *Unio* species was recovered from *U. p. deshayesii* type locality in Brittany. Specimens collected in nearby rivers were morphologically so different from the syntype hold in the collection of the Muséum national d’Histoire naturelle (MNHN, voucher number MNHN 1674) that they have not been considered as proxies for this taxon. No live *Unio* specimens were recovered either in type localities of *U. p. platyrinchoideus* despite intensive researches in scuba diving. Only a batch of shells, very similar to the original description, could be found buried in the mud a few meters below surface, in Lake Aureilhan. The *U. p. rostratus* type locality is vague (“*Habite le Rhône et les grandes rivières de l’Allemagne, de la Silésie, etc.*”), but the subspecies is restricted by Haas (1969) to the Rhône River. No specimen attributable to this taxon was collected from the Rhône itself, but two specimens were collected in the Rhône drainage in Lake Bourget, and one specimen in the Ain River.

The type locality of *U. crassus crassus* (“*In fluviis Europae*”) is vague, but the nominal subspecies has been restricted by Nesemann (1993) to the Scandinavian and northern Europe populations, reaching the Weser River in the western part. This opinion concurs with Falkner et al. (2002), who considered that the nominal subspecies does not occur in France. Type localities of *U. c. cytherea* and *U. c. riparius* are in

Germany. No specimens could be found in the area of occurrence of *U. c. cytherea* given by Falkner et al. (2002) where no *U. crassus* populations are known nowadays. A specimen collected in the Rhine River, in the area of occurrence of *U. c. riparius* according to Falkner et al. (2002), is used as proxy for this subspecies. No sampling has been performed in Franche Comté (type locality of *U. c. nana*) yet, and populations are declining rapidly in the known localities (Mouthon, 2012). No *U. crassus* population have been found in the type locality of *U. c. courtillieri*. However, large populations are known from the Vienne River, an opposite tributary of the Loire River only a few tens of kilometers away, and have been used as proxy for this subspecies.

The *U. tumidus depressus* type locality lies in the UK and was not sampled. Specimens from the Rhine River have been collected and are used as proxies for *U. t. depressus* in France. *U. tumidus* is probably extirpated from the type the locality of *U. t. vinceleus*, although this locality has not been extensively surveyed. Specimens attributable to the nominal subspecies *U. t. vinceleus* were collected in the Seine drainage, where it is believed to be the only occurring subspecies (Falkner et al., 2002).

Results of systematic sampling stresses out that only 10 out of the 19 type localities sampled still host

Unio species populations, and only four of these still host healthy populations (i.e., with abundant live specimens and ongoing recruitment).

DNA analyses and systematic

DNA diversity

We analyzed a total of 272 specimens. We obtained 225 sequences for the COI gene, resulting in a 658 bp fragment, and 86 additional sequences downloaded from GenBank were included the dataset. These represented 66 different haplotypes. A total of 266 sequences were obtained for the 16S gene, and 86 additional sequences were included in the dataset, representing altogether 60 different haplotypes, resulting after alignment in a 494 bp fragment. Eventually, 248 sequences were obtained for the 28S gene resulting after alignment in an 808 bp fragment, with no additional sequences available in GenBank. 28S sequences had only 11 different haplotypes.

Species delimitation

Due to the large variability and plasticity of the shells, the identification of the collected specimens was not

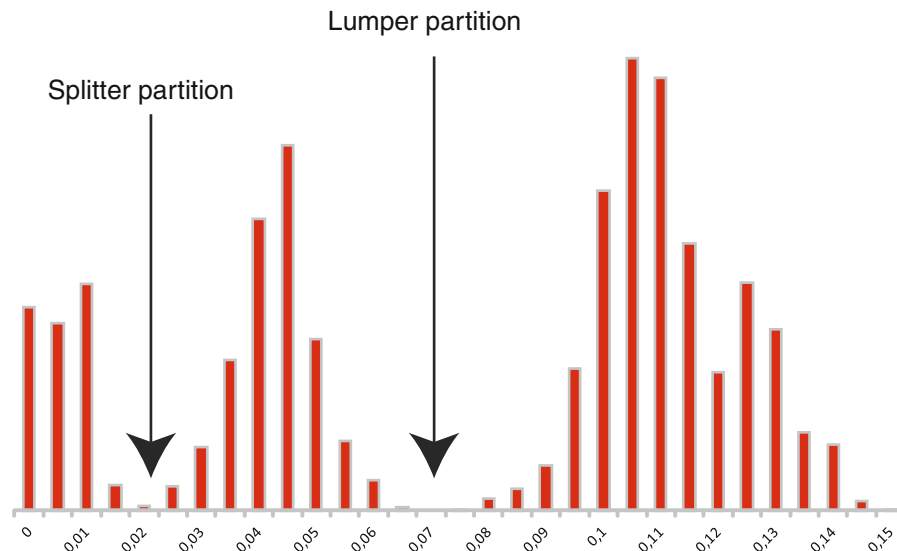


Fig. 1 Barcoding gap estimation for European *Unio* species, based on COI divergence. Two taxonomic hypotheses can be discussed: Splitter partition conserves most European accepted species but implies splitting of *U. crassus*, *U. ravoisieri* and *U.*

gibbus while Lumper partition implies synonymizing *U. mancus*, *U. delphinus*, *U. ravoisieri* and *U. elongatulus* under the name *U. pictorum*

straightforward. We thus relied both on the genetic distances between specimens and on the position of the specimens from type localities in the tree to link species names to groups of specimens. Following a barcoding approach, we used the pairwise distribution of the genetic distances calculated with the Barcode gene COI to potentially identify a gap in the distribution, referred to as the “barcode gap”, between intra and interspecific distances. Two gaps were identified in the pairwise distribution (Fig. 1), and both were used to propose two partitions of Primary Species Hypothesis (PSH—Puillandre et al., 2012). The first gap (~2%) defined the “splitter” partition that divided European *Unio* in 13 PSH, five of them being found in France; the second gap (~7%) defined the “lumper” partition that divided *Unio* in six PSH, three of them being found in France. PSH that included specimens from GenBank were named following the taxonomic identification provided in GenBank. Each of the remaining PSH in the splitter partition were including specimens from one and only one type locality of valid species, and the corresponding name was thus attributed to the PSH. The one exception concerns specimens collected in the type locality of *U. bourgeticus* which clustered either in the *U. mancus* or in the *U. pictorum* clade. However, they morphologically matched the description given by Falkner et al. (2002), but differed from the original description and from the syntypes identified by Graf (2011) in the Locard collection. The name *U. bourgeticus* was therefore considered *incertae sedis*. Several PSH defined in the lumper partition were including specimens from several type localities or linked to several species names in GenBank, and the oldest name, following the priority rule, was attributed to the PSH. The attribution of the taxonomic names to the PSH is summarized in Fig. 2.

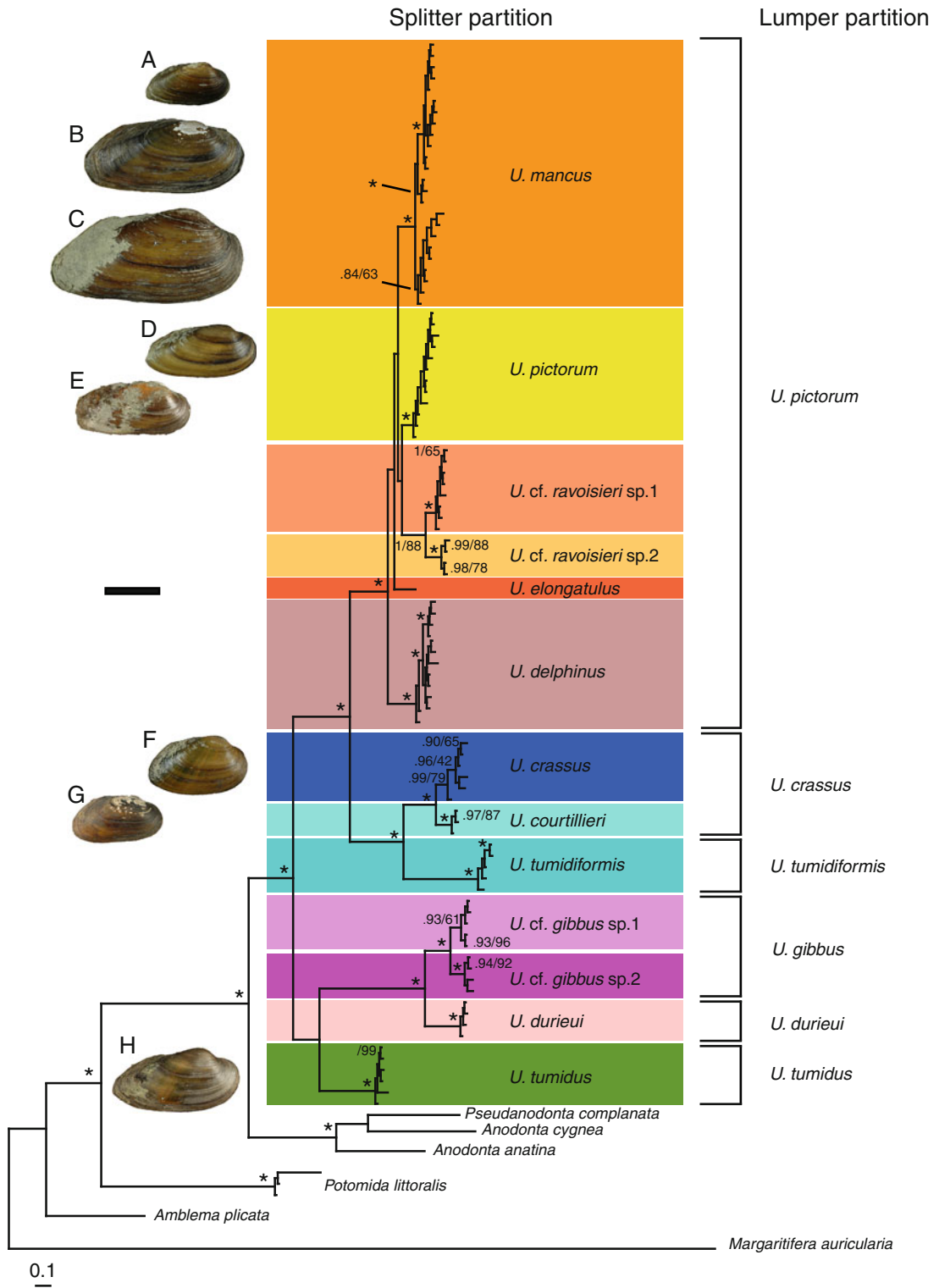
All PSH in both partitions were monophyletic and highly supported with the COI gene (Online Resource 3—Supplementary material). Overall variability of the 16S gene was slightly less than that of the COI gene (60 vs 66 haplotypes), although more sequences could be obtained. Here again, all PSH were monophyletic and highly supported (Online Resource 4—Supplementary material), except *U. pictorum* (PP = 0.11) and *U. mancus* (PP = 0.64). Within the latter, subspecies considered by Prié et al. (2012), based on COI only, are even better supported by the 16S analyses. The 28S gene was found to be largely less variable

Fig. 2 Phylogenetic tree based on Bayesian inference, using the combined COI, 16S and 28S genes dataset. The scale bar indicates the branch length. Asterisks: Posterior probabilities ≥ 0.95 and bootstrap values >90 ; other node significant support values are mentioned in the figure. Black bars indicate species level. Illustrated shells as follows: (A) *U. m. mancus*, lectotype, MNHN 24632; (B) *U. m. turtonii*, Tavignanu River, MNHN-IM-2009-12761; (C) *U. m. requienii*, Gravière Lake, MNHN-IM-2009-17775; (D) *U. pictorum*, Aisne River, MNHN-IM-2009-17802; (E) *U. pictorum*, Lake Bourget, MNHN-IM-2009-12702; (F) *U. c. crassus*, Aisne River, MNHN-IM-2009-17794; (G) *U. c. courtillieri*, Vienne River, MNHN-IM-2009-12564; (H) *U. tumidus*, Seine River, MNHN-IM-2009-12606. Scale bar: 5 cm. All MNHN specimens with an IM catalog number prefix are sequenced vouchers

than mitochondrial ones (Online Resource 5—Supplementary material). *Unio* species were including 11 different haplotypes only. *U. tumidus*, *U. cf. ravoisieri* sp. 1 and sp. 2 (as defined in the splitter partition) were characterized by a single haplotype, while other PSH had three (*U. pictorum*) or four (*U. mancus* and *U. crassus*) different haplotypes, some of them being shared by different species.

Phylogenetic relationships

Pseudanodonta, *Anodonta*, and *Unio* genera formed a monophyletic clade in COI, 16S and 28S phylogenies (Online Resources 3–5—Supplementary material), supporting the monophyly of the Unioninae subfamily. Within the Unioninae, *Pseudanodonta* and *Anodonta* species in one hand and *Unio* species in the other hand formed two distinct clades, supporting the monophyly of the Unionini and Anodontini tribes. However, apart from *Unio*, only a few species of Unioninae were included in the analysis, and these results need to be confirmed with a larger sampling. With the 28S gene, *Pseudanodonta*, *Anodonta* and *Unio* genus still form a monophyletic clade, but the *A. cygnaea* 28S sequence downloaded from GenBank was included in the *Unio* genus, which could result from a misidentification of the specimen. With the COI and 16S genes, *Unio* was divided into three supported clades: *U. durieui* and *U. gibbus*; *U. tumidus*; and a large clade including all other PSH (as defined in the splitter partition). Within the later, *U. tumidiformis* and *U. crassus* were found to be sister species, while *U. elongatulus*, *U. delphinus*, *U. pictorum*, *U. mancus*, and *U. ravoisieri* were clustered in another well-supported clade (= *U. pictorum* in the lumper partition) with the COI gene only.



Since no supported incongruence was found between the COI, 16S and 28S phylogenetic trees, a phylogenetic tree based on the combined dataset was created by concatenation of these three genes, resulting in a 1,961 bp long fragment (Fig. 2). In addition to the results obtained with the independent analyses, the phylogeny obtained with the combined dataset suggests that *Potomida* is more closely related to Unioninae than *Amblema*, but once again the low number of species, apart for *Unio*, included in the dataset, prevents any robust clarification of the unclear taxonomic position of *Potomida* (Graf & Cummings, 2007). Within the *Unio* genus, all PSH formed well-supported clades, as well as the three subspecies of *U. manicus* proposed by Prié et al. (2012).

Discussion

French naiad species and subspecies delimitation and distribution

Most species of French *Unio* were described in a time when species were only defined as morphologically distinct entities, ignoring other now widely accepted criteria such as monophyly or reproductive isolation. Species are now widely accepted as definitely divergent lineages in the genealogical network (De Queiroz, 1999; Samadi & Barberousse, 2006) and treated as hypotheses engaged in a process of modification and validation formalized in the integrative taxonomy approach (Dayrat, 2005; Will et al., 2005; Padial et al., 2010; Puillandre et al., 2012). As a first step, we used the pairwise distribution of COI genetic distances to define two partitions (splitter and lump), based on the presence of two gaps in this distribution. All the groups defined correspond to supported clades in the molecular phylogeny. However, because of potential problems linked to, e.g., incomplete lineage sorting or introgression (Funk & Omland, 2003; Chase et al., 2005) genetic distances and monophyly assessed using a single genetic marker only is not satisfactory. In an integrative approach, other characters widely used include morphological variability, geographic distribution or ecological parameters. In the case of *Unio*, morphological characters have been shown to be highly plastic, and our own experience confirmed the difficulty to identify the shells. Nevertheless, the distributions of the PSHs *U. crassus* and *U. courtillieri*

are largely overlapping in France (Fig. 3c), which would suggest a reproductive isolation. The PSHs *U. pictorum* and *U. manicus* not only live in sympatry as well in most French drainages (Fig. 3a, b), but also seem to have different ecological requirements. Species distribution models (Prié et al. unpublished.) suggest that annual mean temperature is an important explanatory variable for both species, and model previsions peak at about 10°C for *U. pictorum* and 15°C for *U. manicus*. Geographical and ecological parameters therefore support the splitter partition. At the genetic level, the absence of recombination between two unlinked markers is generally seen as a strong evidence for the presence of different species. The 16S gene is not independent from the COI gene (both are linked in the mitochondrial genome) and cannot be used to test the absence of recombination between the groups defined with the COI gene. Being a nuclear gene, the 28S could have achieved this goal, but the lack of variability compared with the COI gene prevents any reliable conclusion. Variable nuclear markers are not commonly sequenced in bivalves: most available markers in GenBank are more conserved and used to resolve deep phylogenetic relationships. The ITS2 marker could have been adapted (Källersjö et al., 2005), but the high rate of amplification failure on our dataset was prohibitive.

As no convincing biological data is available to discriminate between alternate PSH partitions for the French *Unio*, other criteria can be used to turn the scales toward one or the other PSH partition, knowing that such criteria can in no case be considered as robust as the biological criteria used in an integrative taxonomy approach. Here we propose to rely on the currently accepted taxonomy of the French *Unio* to minimize the changes in species hypotheses, i.e., trying to maximize the congruence between species currently considered as valid and our PSH partitions. Following the splitter partition, five PSHs are found in France, three of them corresponding to three accepted species (*U. manicus*, *U. pictorum*, and *U. tumidus*) and two corresponding to two accepted subspecies of *U. crassus* (*U. c. crassus* and *U. c. courtillieri*) that would here be elevated at the species level. The other PSH of the splitter partition all correspond to non-French valid species, except *U. ravoisieri* and *U. gibbus* that include each two PSHs. Following the lump partition, the two French species *U. manicus* and *U. pictorum* would be synonymized with other European species (*U. ravoisieri*, *U.*

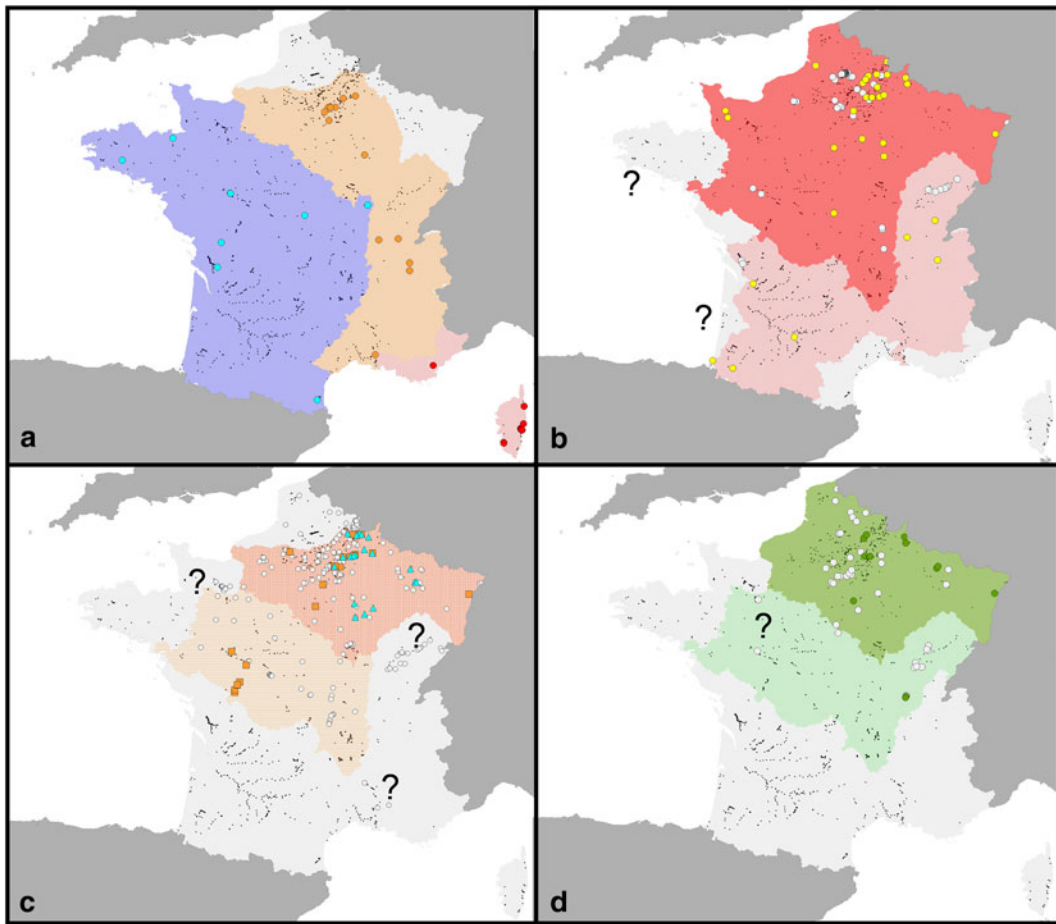


Fig. 3 Distribution maps of the seven taxa supported by our analyses, based on main drainages. *Black dots* available data on French Naiads; *empty dots* recent shell data; *plain dots* specimens sequenced for this study. **a** French distribution of *U. manicus* and its three accepted subspecies, *U. m. manicus* in the Atlantic drainages, *U. m. requienii* in the Seine and Rhone drainages and *U. m. turtonii* in south-east France and Corsica. **b** French distribution of *U. pictorum*, *dark area* = main area of occurrence, *pale area* = area of punctual occurrences. Population from the Landes Lakes attributable to *U. p. platyrinchoideus* and populations from

elongatulus and *U. delphinus*) in a single species (*U. pictorum*). Other French (*U. crassus* and *U. tumidus*) and non-French (*U. tumidiformis*, *U. gibbus* and *U. durieu*) species each correspond to a separate PSH.

Whatever the partition considered (splitter or lump), most currently accepted subspecies (Gargominy et al., 2011) are not supported by our data. In a previous study (Prié et al., 2012), we focused on *U. manicus* subspecies by analyzing COI gene only and concluded to a genetic structure within *U. manicus*, with three clades corresponding to the accepted subspecies

Brittany attributable to *U. p. deshayesii* have not been studied and remain *incertae sedis*. **c** French distribution of *Unio crassus* and its two accepted PSH, *U. cf. crassus* (*vertical lines*) and *U. cf. courtillieri* (*horizontal lines*). Populations from Normandy have not been studied, nor population from Franche-Comté attributable to *U. c. nanus*. No specimen could be collected from the isolated populations of southern France, which identity is still unknown. **d** French distribution of *U. tumidus*, *dark area* = main area of occurrence, *pale area* = area of punctual occurrence. No live specimen could be collected from the Loire drainage

U. m. manicus, *U. m. requienii* and *U. m. turtonii*. The combined dataset analyzed here not only confirms these results but strengthens the subspecific clades support (although *U. m. requienii* clade remains less supported by our analyses, with PP = 0.84 and bootstrap = 63).

Falkner et al. (2002) recognized four subspecies within *U. pictorum* in France (Table 1). The live topotypes of *U. cf. brindosianus* were collected from Lake Brindos but they could not be separated from *U. pictorum* by the COI nor 16S sequences. *U. p. platyrinchoideus* (following the exact spelling by

Dupuy in the original description) seems to be extirpated from its type locality and no live *Unio* specimen could be collected despite intensive search in type and surrounding localities. Historical material and material collected in its type locality (shells only, illustrated in Prié, 2012) shared with specimens from Lake Brindos a larger and conspicuously iridescent shell which is believed to result from environmental conditions (specimens from lakes tend to be larger than those living in rivers (Ortmann, 1920) and shell color may result from water quality). Our data suggest that *U. cf. brindosianus* is a synonym of *U. pictorum*, and *U. cf. platyrinchoideus* should still be considered *incertae sedis* pending on further studies.

Neither live specimens nor shells only morphologically corresponding to *U. p. deshayesii* have been recently collected in Brittany. Specimens from nearby localities, found to belong to *U. m. mancus*, were not considered as proxies as they were morphologically very different from the syntype conserved in the MNHN collection (voucher number MNHN 1674). The identity of *U. p. deshayesii* is still awaiting further studies.

Type locality of *U. p. rostratus* is vague, but the name has been restricted by Falkner et al. (2002) to the populations from the Rhône and Saône Rivers. Specimens collected from the Saône River were included either with *U. mancus* or *U. tumidus* clades. Specimens from Lake Bourget and Ain River were not distinct from *U. pictorum*. Because collected material is scarce (3 specimens only), this taxon is still considered *incertae sedis* pending further studies.

Falkner et al. (2002), considered four subspecies of *U. crassus* to occur in France. Two distinct clades are observed in both COI and 16S phylogenies, which are also well supported in the combined dataset phylogeny. Specimens from the Loire drainage, which correspond to *U. c. courtillieri* according to Falkner et al. (2002), all cluster in one clade, together with specimens from the Seine drainage and one specimen from the Rhine River. The other clade clusters specimens from the Seine and Rhine drainages, which corresponds to *U. c. riparius* distribution in France according to the same authors. However, this clade also includes specimens from Sweden (Källersjö et al., 2005) and Ukraine (Yanovich et al., unpublished data). Our analyses therefore suggest that only two taxa can be considered in France: *U. cf. courtillieri* from the Loire, Seine, and Rhine drainages and *U. cf. crassus* from the Seine and Rhine drainages. No molecular

data is available to discuss the subspecies *U. c. nanus* and *U. c. cytherea*, which remain *incertae sedis*.

The type locality of *U. t. vinceleus* seems extirpated, but according to Falkner et al. (2002), this subspecies is found in the Loire and Seine drainages. While no live specimen was collected from the Loire drainage, specimens from the Seine drainage did not diverge genetically from other populations of northeast France. According to the same authors, *U. t. depressus* is restricted in France to the “Escaut (Meuse) and Rhine (Moselle)” Rivers. Specimens from the Meuse do not differ genetically from specimens sampled in the Seine basin nor from the specimens from Sweden (Källersjö et al., 2005). None of the accepted *U. tumidus* subspecies is supported by our data.

Conservation issues

Systematic sampling of historical localities confirms the high rate of naiad population decline in France, with about 40% of populations at type localities being extirpated (Table 1). France is at the crossroads between northern and southern influences with species such as *U. crassus* or *U. pictorum* reaching their southernmost area of distribution in France and *P. littoralis* and *U. mancus* reaching their northernmost area of distribution. Chronic changes in environmental conditions are likely to have greater impact on those individuals at the edges of a species range than those at the centre (Wilson et al., 2010) and indeed, peripheral populations referred to as *U. c. nanus* and *U. p. rostratus* in the Rhône drainage or *U. t. vinceleus* and *U. p. platyrinchoideus* in the west could not be found again. It is therefore uncertain if these taxa should be considered synonyms or valid but extinct.

Aquatic ecosystems have been strongly impacted by human activities. Water quality has been globally declining, sediment quality has been modified by dams and channelization (Sabater, 2008; Sabater & Tockner, 2010), and these changes may have locally led to extirpation of populations. The establishment of canals in the nineteenth and twentieth centuries has connected previously isolated drainages. Fish translocation induce the translocation of associated bivalves through the larval parasitic stage (Nagel, 2000; Gherardi et al., 2008; Cappelletti et al., 2009) resulting in new gene pools being introduced to historical localities. Potential colonization and introgression may have led to a homogenization of gene pools

(e.g., Falkner, 1991) and nowadays geographical genetic structuring may be different from that in the nineteenth century when names were established. While our study does not support most of the subspecific taxonomic units of the actual French checklist, it remains uncertain if these taxa have ever formed distinct evolutionary units and became extirpated or if they are just ecotypes.

Conservation genetics highlight the importance of genetic variability for conservation purposes (Mulvey et al., 1997; Backeljau, 2001; Machordom et al., 2003; Geist, 2010; Geist et al., 2010; Skidmore et al., 2010) and clarifying the taxonomic status of potentially endangered evolutionary units is essential as legislative texts protect species through names. But taxonomic choices themselves may impact conservation. In one hand, splitting taxa tends to increase protection (Morrison et al., 2009) and overlooked species may become extinct because they are considered synonym of another (May, 1990; Mace, 2004). Conversely, taxonomic inflation may become a serious obstacle to conservation (Isaac et al., 2004; Pillon & Chase, 2006). A large number of names makes it difficult to establish checklists, can lead to misidentification of diversity centers and priority conservation areas, and some named taxa may receive conservation attention when they have no biological reality. Moreover, current legislation and environmental policies are based on species names and it is not clear if splitting of a protected species still maintain protection status of the newly established taxon. With this caveat in mind, the conservative option in the case of *U. crassus* could be considered more cautious from a conservation point of view. If both observed lineages are considered subspecies, they will remain protected under the name *U. crassus*. If *U. c. courtillieri* is considered a distinct species, it may be buried in a legal loophole until the legislative texts are updated.

Conclusion

Lack of variable nuclear genes and of data on ecology for most species, associated to difficulties to interpret the morphological variability and to recent changes in geographic distributions and declines of historical populations, prevent any reliable conclusion on the species and subspecies taxonomy of the French *Unio*. However, we retained two likely partitions, each

confirming the validity of most French species (three species in one partition, with *U. pictorum* and *U. mancus* synonymized, five in the other, with *U. crassus* being split in two species, *U. crassus* and *U. courtillieri*), while actual nominal subspecies have globally not been recovered. According to our data, the French checklist can now be restricted to seven taxa: *U. m. mancus*, *U. m. requienii*, *U. m. turtonii*; *U. pictorum*; *U. crassus*, *U. cf. courtillieri*, and *U. tumidus*. Despite intensive sampling, we could not re-find specimens attributable to *U. c. nanus*, *U. c. cytherea*, *U. p. rostratus* and *U. p. platyrinchoideus*. Sampled specimens attributable to *U. m. aleronii*, *U. m. bourgeticus*, *U. m. brindosianus*, *U. m. moquinianus*, *U. t. depressus*, and *U. t. vinceleus* on the basis of their accepted distributions were all found to belong to one or the other of the taxa mentioned above. Although sampling topotypes is in principle the most reliable approach to evaluate the status of nominal subspecies, introgression and colonization may have modified the fauna of type localities. Whether these taxa have to be considered extinct lineages or only morphotypes remains questionable. Sequencing of the type material, which consist of shells only, would be the only way to re-evaluate the taxonomy of these taxa. If promising development in genetic analyses are ongoing (e.g., Geist et al., 2008), they still imply partial destruction of the type material and can therefore hardly be applied for taxonomic purposes. Following Bouchet (2006) and the “valid until synonymized” concept, the validity of these taxa is still pending on further studies. However, we consider that state of the art in taxonomy has to rely on ground-truthed data, and therefore pragmatically propose to consider only the seven taxa characterized by our molecular data in the current French checklist. The taxonomic level of these taxa is still questionable, as barcoding gap provides two species delimitation hypotheses. Considering the 2% gap as a threshold for species delimitation would lead to a splitting of *U. crassus*, *U. gibbus* and *U. ravoisieri* into six species. Conversely, lumping currently valid species under the 7% divergence threshold argument would drastically reduce the number of species names in Europe. If regarded as a result of past geographic isolation, the different lineages observed here may be worthy of conservation efforts: for the past millennia, freshwater mussels were “prisoners” within hydrographic basins, within and between which dispersion was carried out by host fishes. However, artificial

connections between main drainages are now the norm and navigation canals and fish translocation artificially connect previously isolated drainages. In an age of global connections, the operational taxonomic units described by our phylogenetic analyses may be threatened by globalization, introductions and introgression. Our results question the philosophy and long-term goals of unionid conservation action: should our state of reference be the fast-eroding genetical units of the nineteenth century, or should we pragmatically accept Operational Conservation Units aligned with the ongoing globalization of fluvial connections and fish translocations?

Acknowledgments Benjamin Adam (Biotope), Jean-Michel Bichain, Michel Bramard (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques), Gilbert Cochet, Xavier Cucherat (Biotope), Erwann Jacquin (Deli-Sports), Florent Lamand (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques), Olivier Hesnard, Patrick Le Mao, Joseph Matei (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques), Marie-Lilith Patou (Biotope), Pierre-Yves Pasco (Bretagne vivante), Henri Persat (Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés), Laurent Philippe (Biotope), Ludwick Simon (Biotope), Sylvain Vrignaud and Antoine Wagner all took part in the sampling effort. Gérard Tardivo (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de la région Centre) and Stéphane Laine (Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie) sanctioned a special authorization for sampling the protected species *U. crassus*. The authors also thank Barbara Buge for her help in curating the MNHN collection and Rafael Araujo and Gargo Fontaine for constructive discussions during the redaction of this paper. Ian Killeen has edited the English. We also thank two anonymous reviewers for their constructive comments that allowed improving the overall quality of the manuscript. This study was completed with financial support of Biotope (PI Frederic Melki) and grants from Muséum national d'Histoire naturelle à Paris ATM Barcode (PIs Sarah Samadi and Jean-Noël Labat) and Agence Nationale de la Recherche "6eme extinction" (PI Philippe Bouchet).

References

- Agrell, I., 1948. The shell morphology of some Swedish unionids as affected by ecological conditions. *Arkiv för Zoologi* 41A: 1–30.
- Araujo, R., I. Gómez & A. Machordom, 2005. The identity and biology of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (= *U. elongatulus*) (Bivalvia: Unionidae) in the Iberian Peninsula. *Journal of Molluscan Studies* 71: 25–31.
- Araujo, R., C. Toledo, D. V. Damme, M. Ghamizi & A. Machordom, 2009a. *Margaritifera marocana* (Pallary, 1918): a valid species inhabiting Moroccan rivers. *Journal of Molluscan Studies* 75: 95–101.
- Araujo, R., C. Toledo & A. Machordom, 2009b. Redescription of *Unio gibbus* Spengler, 1793, a west palaeartic freshwater mussel with hookless glochidia. *Malacologia* 51: 131–141.
- Backeljau, T., 2001. Genetic and phylogenetic data in Molluscan conservation. 17. In Salvini-Plawen, L., J. Voltzow, H. Sattmann & G. Steiner (eds), *World Congress of Malacologia*. Unitas Malacologia, Vienna, Austria.
- Bouchet, P., 2006. Valid until synonymized, or invalid until proven valid? A response to Davis (2004) on species check-lists. *Malacologia* 48: 311–319.
- Cappelletti, C., S. Cianfanelli, M. E. Beltrami & F. Ciutti, 2009. *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionidae): a new non-indigenous species in Lake Garda (Italy). *Aquatic Invasions* 4: 685–688.
- Chase, M. W., N. Salamin, M. Wilkinson, J. M. Dunwell, R. P. Kesanakurthi, N. Haidar & V. Savolainen, 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1889–1895.
- Dayrat, B., 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407–415.
- de Queiroz, K., 1999. The general lineage concept of species and the defining properties of the species category. In Wilson, R. A. (ed.), *Species: New Interdisciplinary Essays*. MIT Press, Cambridge: 79–89.
- Falkner, G., 1991. Schnecken und Muscheln. In O. Aßmann (ed.), *Stützkraftstufe Landau a. d. Isar – Entwicklung der Pflanzen- und Tierwelt in den ersten 5 Jahren*. Schriftenreihe des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft, München: 95–108, 149–154.
- Falkner, G., T. E. J. Ripken & M. Falkner, 2002. Mollusques continentaux de la France. Liste de référence annotée et bibliographie. *Patrimoine Naturels* 52: 1–350.
- Funk, D. J. & K. E. Omland, 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 34: 397–423.
- Gargominy, O., V. Prié, J.-M. Bichain, X. Cucherat & B. Fontaine, 2011. Liste de référence annotée des mollusques continentaux de France. *MalaCo* 7: 307–382.
- Geist, J., 2010. Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of Conservation Genetics and Ecology. *Hydrobiologia* 644: 69–88.
- Geist, J., H. Wunderlich & R. Kuehn, 2008. Use of mollusc shells for DNA-based molecular analyses. *Journal of Molluscan Studies* 74: 337–343.
- Geist, J., H. Söderberg, A. Karlsberg & R. Kuehn, 2010. Drainage-independent genetic structure and high genetic diversity of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) in northern Europe. *Conservation Genetics* 11: 1339–1350.
- Germain, L., 1931. Mollusques terrestres et fluviatiles (seconde partie). Paul Lechevalier, Paris.
- Gherardi, F., S. Bertolino, M. Bodon, S. Casellato, S. Cianfanelli, M. Ferraguti, E. Lori, G. Mura, A. Nocita, N. Riccardi, G. Rossetti, E. Rota, R. Scalera, S. Zerunian & E. Tricarico, 2008. Animal xenodiversity in Italian inland waters: distribution, modes of arrival, and pathways. *Biological Invasions* 10: 435–454.

- Graf, D. L., 2011. Types of French freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia, Unionoidea) in the Arnould Locard Collection at the Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. *Zoosystema* 33: 451–514.
- Graf, D. L. & K. Cummings, 2007. Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoidea). *Journal of Molluscan Studies* 73: 291–314.
- Haas, F., 1940. A tentative classification of the Palearctic unionids. *Zoological Series of Field Museum of Natural History* 24: 115–141.
- Haas, F., 1969. Superfamilia Unionacea. De Gruyter, Berlin.
- Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Huelsenbeck, J. P., F. Ronquist & B. Hall, 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Isaac, N. J. B., J. Mallet & G. M. Mace, 2004. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 464–469.
- Jovelin, R. & J.-L. Justine, 2001. Phylogenetic relationships within the polyopisthocotylean monogeneans (Platyhelminthes) inferred from partial 28S rDNA sequences. *International Journal for Parasitology* 31: 393–401.
- Källersjö, M., T. von Proschwitz, S. Lundberg, P. Eldenäs & C. Erséus, 2005. Evaluation of ITS rDNA as a complement to mitochondrial gene sequences for phylogenetic studies of freshwater mussels: an example using Unionidae from north-western Europe. *Zoologica Scripta* 34: 415–424.
- Khalloufi, N., C. Toledo, A. Machordom, M. Boumaïza & R. Araujo, 2011. The Unionids of Tunisia: taxonomy and phylogenetic relationships, with redescription of *Unio ravoisieri* Deshayes, 1847 and *U. durieui* Deshayes 1847. *Journal of Molluscan Studies* 77: 103–115.
- Locard, A., 1893. *Conchyliologie française. Les Coquilles des eaux douces et saumâtres de France. Description des familles, genres et espèces.* J.-B. Baillière & fils, Paris.
- Lydeard, C., R. H. Cowie, W. F. Ponder, A. E. Bogan, P. Bouchet, S. A. Clark, K. S. Cummings, T. J. Frest, O. Gargominy, D. G. Herbert, R. Hershler, K. E. Perez, B. Roth, M. B. Seddon, E. E. Strong & F. G. Thompson, 2004. The global decline of nonmarine Mollusks. *BioScience* 54: 321–330.
- Mace, G. M., 2004. The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 359: 711–719.
- Machordom, A., R. Araujo, D. Erpenbeck & M. A. Ramos, 2003. Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionoidea). *Biological Journal of the Linnean Society* 78: 235–252.
- May, R., 1990. Taxonomy as destiny. *Nature* 347: 129–130.
- McMurray, S. E., G. A. Schuster & B. A. Ramey, 1999. Recruitment in a freshwater Unionid (Mollusca: Bivalvia) community downstream of Cave Run Lake in the Licking River, Kentucky. *American Malacological Bulletin* 15: 57–63.
- Miller, M. A., W. Pfeiffer & T. Schwartz, 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 November 2010, New Orleans: 1–8.
- Morrison, W. R., J. L. Lohr, P. Duchon, R. Wilches, D. Trujillo, M. Mair & S. S. Renner, 2009. The impact of taxonomic change on conservation: does it kill, can it save, or is it just irrelevant? *Biological Conservation* 142: 3201–3206.
- Mouthon, J., 2012. Les mollusques de deux rivières franco-comtoises le Drugeon et la Clauge, comparaison entre les inventaires 1977–1978 et 2009–2010. *MalaCo* 8: 412–419.
- Mulvey, M., C. Lydeard, D. L. Pyer, K. M. Hicks, J. Brim-Box, J. D. Williams & R. S. Butler, 1997. Conservation genetics of North American freshwater mussels *Amblema* and *Megalonaia*s. *Conservation Biology* 11: 867–878.
- Nagel, K.-O., 1992. Das Schalenwachstum dreier Muschelarten (Bivalvia: Unionidae) in der Schwalm, einem nordhessischen Mittelgebirgsfluß. *Decheniana* 145: 165–176.
- Nagel, K.-O., 2000. Testing hypotheses on the dispersal and evolutionary history of freshwater mussels (Mollusca: Bivalvia: Unionidae). *Journal of Evolution Biology* 13: 854–865.
- Nagel, K.-O. & G. Badino, 2001. Population genetics and systematics of the European Unionidae. In Bauer, G. & K. Wächtler (eds), *Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionidae*. Springer, Berlin: 51–81.
- Nesemann, H., 1993. Zoogeographie und Taxonomie der Muschel-Gattungen *Unio* Philipsson, 1788, *Pseudanodonta* Bourguignat, 1877 und *Pseudunio* Haas, 1910, im oberen und mittleren Donausystem (Bivalvia: Unionidae, Margaritiferidae). *Nachrichtenblatt der Ersten Vorarlberger Malakologischen Gesellschaft* 1: 20–40.
- Ortmann, A. E., 1920. Correlation of shape and station in freshwater mussels (Naiades). *Proceedings of the American Philosophical Society* 59: 268–312.
- Padial, J. M., A. Miralles, I. De la Riva & M. Vences, 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7: 16.
- Palumbi, S. R., 1996. Nucleic acids II: the Polymerase Chain Reaction. In Hillis, D. M., C. Moritz & B. K. Mable (eds), *Molecular Systematics*, 2nd ed. Sinauer, Sunderland, MA: 205–247.
- Pillon, Y. & M. W. Chase, 2006. Taxonomic exaggeration and its effects on orchid conservation. *Conservation Biology* 21: 263–265.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253–1256.
- Prié, V., 2012. Les sous-espèces de la Mulette méridionale *Unio mancus* Lamarck 1819 (Bivalvia, Unionoidea) en France : descriptions originales et matériel topotypique. *MalaCo* 8: 428–446.
- Prié, V., N. Puillandre & P. Bouchet, 2012. Bad taxonomy can kill: molecular reevaluation of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Unionidae) and its accepted subspecies. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 405: 18.
- Puillandre, N., M. V. Modica, Y. Zhang, L. Sirovitch, M.-C. Boisselier, C. Cruaud, M. Holford & S. Samadi, 2012. Large scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology* 21: 2671–2691.
- Rambaut, A. & A. J. Drummond, 2007. Tracer v1.4. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

- Reis, J. & R. Araujo, 2009. Redescription of *Unio tumidiformis* Castro, 1885 (Bivalvia, Unionidae), an endemism from the south-western Iberian Peninsula. *Journal of Natural History* 43: 1929–1945.
- Rozas, J. & R. Rozas, 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174–175.
- Sabater, S., 2008. Alteration of the global water cycle and their effects on river structure, function and services. *Freshwater reviews* 1: 75–88.
- Sabater, S. & K. Tockner, 2010. Effects of hydrologic alterations on the ecological quality of river ecosystems. In Sabater, S. & D. Barcelo (eds), *Water Scarcity in the Mediterranean: Perspectives Under Global Change*. Springer, Berlin: 15–39.
- Samadi, S. & A. Barberousse, 2006. The tree, the network, and the species. *Biological Journal of the Linnean Society* 89: 509–521.
- Skidmore, R., C. Leach, J. Hoffman, W. Amos & D. C. Aldridge, 2010. Conservation genetics of the endangered depressed river mussel, *Pseudonodonta complanata*, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 20: 560–567.
- Soroka, M., 2010. Characteristics of mitochondrial DNA of Unionid bivalves (Mollusca: Bivalvia: Unionidae). I. Detection and characteristics of doubly uniparental inheritance (DUI) of Unionid mitochondrial DNA. *Folia Malacologica* 18: 147–188.
- Srivathsana, A. & R. Meier, 2012. On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics* 28: 190–194.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Watters, G. T., 1994. Form and function of unionoidean shell sculpture and shape (Bivalvia). *American Malacological Bulletin* 11: 1–20.
- Will, K. P., B. D. Mishler & Q. D. Wheeler, 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54: 844–851.
- Wilson, C. D., D. Roberts & N. Reid, 2010. Applying species distribution modelling to identify areas of high conservation value for endangered species: a case study using *Margaritifera margaritifera* (L.). *Biological Conservation* 144: 821–829.
- Zieritz, A. & D. C. Aldridge, 2009. Identification of ecophenotypic trends within three European freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoidea) using traditional and modern morphometric techniques. *Biological Journal of the Linnean Society* 98: 814–825.
- Zieritz, A., A. G. Checa, D. C. Aldridge & E. M. Harper, 2010a. Variability, function and phylogenetic significance of periostracal microprojections in unionid bivalves (Mollusca). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 49: 6–15.
- Zieritz, A., J. I. Hoffman, W. Amos & D. C. Aldridge, 2010b. Phenotypic plasticity and genetic isolation-by-distance in the freshwater mussel *Unio pictorum*. *Evolutionary Ecology* 24: 923–938.

II.1.5 La Doubly Uniparental Inheritance : une singularité de l'hérédité de quelques groupes de bivalves, dont le genre *Unio*.

Dans le règne animal, l'ADN mitochondrial (ADNmt) est généralement hérité des femelles : lors de la fécondation, le spermatozoïde fait passer son noyau dans l'ovule, mais pas ses mitochondries. Dans les années 1990, plusieurs auteurs ont mis en évidence de très faibles quantités d'ADNmt mâle chez la drosophile (Satta *et al.* 1988 ; Kondo *et al.* 1990), les souris (Gyllensten *et al.* 1991) et les poissons (Magoulas & Zouros 1993). Mais au-delà de ces " fuites d'héritage paternel " (Steward *et al.* 1995 ; Fisher & Skibinski 1990) ont découvert chez *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 et *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819 de très forts taux d'hétéroplasmie, en particulier chez les mâles. Ces résultats ont été confirmés par les études ultérieures (Hoeh *et al.* 1991 ; Zouros *et al.* 1992). Skibinski *et al.* (1994a, 1994b) et Zouros *et al.* (1994a, 1994b) ont décrit simultanément ce type de transmission de l'ADNmt, qui a été nommée la Doubly Uniparental Inheritance (DUI) : les femelles sont homoplasmiques (ADNmt hérité de la mère), tandis que les mâles sont hétéroplasmiques (l'ADNmt provient à la fois du père et de la mère). Les spermatozoïdes produits par les mâles hétéroplasmiques ne contiennent que l'ADNmt mâle hérité de leur père.

On a donc au sein de la mitochondrie deux lignées évolutives distinctes. Stewart *et al.* (1995) et Garrido-Ramos *et al.* (1998) montrent qu'il y a ensuite une ségrégation de ces deux lignées dans les cellules corporelles, l'ADNmt femelle étant présent essentiellement dans les tissus somatiques, l'ADNmt mâle se concentrant dans les organes sexuels impliqués dans la spermatogénèse (Obata *et al.* 2007). La DUI est connu dans au moins trois lignées évolutives de bivalves, les ordres des Mytiloida, Unionoida et Veneroida. Les lignées d'ADNmt mâle les plus anciennes se trouvent chez les Unionidae (Breton *et al.* 2009). Doucet-Beaupré *et al.* (2010) montrent que la DUI est un caractère ancestral des bivalves autolamellibranches qui a été perdu ultérieurement.

Les seules séquences d'ADNmt mâle chez les Unionida en Europe proviennent de Soroka (2005). Dans le cadre de ce travail, des séquences d'ADNmt mâle ont été amplifiées involontairement pour le gène COI. De l'ADNmt mâle a été amplifié chez 32 spécimens, dont 30 séquences exploitables appartenant aux lignées *U. m. mancus* (1), *U. m. requienii* (2), *U. m. turtonii* (1), *U. pictorum* (11), *U. c. courtillieri* (9), *U. c. crassus* (5), *U. tumidus* (3). Pour quatre spécimens (illustrés Fig. 24), j'ai également pu amplifier le gène COI femelle. Par ailleurs, une douzaine d'amplifications ont fourni des chromatogrammes à doubles pics, inexploitable, qui pourraient être dus à l'amplification des de fragments mâles et femelles en même temps. En revanche, il n'y a jamais eu de séquences mâles pour le 16S.

Les séquences d'ADNmt mâle fournissent un critère supplémentaire, indépendant de l'ADNmt femelle qui a été utilisé pour établir les PSH pour la délimitation des espèces.

La phylogénie de l'ADNmt mâle (Fig. 24) n'est pas parfaitement congruente avec celle de l'ADNmt femelle. On retrouve deux clades bien soutenus qui correspondent aux spécimens identifiés à l'aide du gène 16S comme (1) *U. pictorum* et *U. mancus*, (2) *U. crassus* et *U. tumidus*. Le clade (1) se subdivise en deux clades. Le clade (1.1) regroupe quatre spécimens identifiés comme *U. mancus*, et deux spécimens identifiés comme *U. pictorum* par le 16S et le COI femelle. Les spécimens correspondant à *U. pictorum*, *U. m. mancus* et *U. m. requienii* se regroupent dans le même clade (1.1.1), mais pas le spécimen correspondant à *U. m. turtonii*, ce qui confirme la singularité génétique de ces populations. Tous les *U. pictorum* se regroupent dans le même clade (1.2), au sein duquel s'intègre un spécimen identifié par le 16S comme *U. tumidus*.

Le clade (2) regroupe tous les spécimens identifiés comme *U. crassus*. Il se subdivise en deux clades bien soutenus, mais qui ne correspondent pas aux deux lignées évolutives correspondant à *U. c. crassus* et *U. c. courtillieri*. Au sein du clade (2.1) s'insère un spécimen identifié comme *U. tumidus* par le gène 16S.

Ces résultats indiquent (i) que l'hybridation entre les différentes espèces d'*Unio* n'est pas rare (quatre cas sur les trente séquences obtenues pour la France, soit >10% des spécimens), ce qui expliquerait les cas de convergence de forme ; (ii) que les deux lignées maternelles observées en syntopie chez *U. crassus* (*U. c. crassus* et *U. c. courtillieri*) ne résultent pas d'une barrière de reproduction, mais pourraient résulter par exemple d'une rétention de polymorphisme ancestral, ou d'un tri des lignées comme attendu par hasard dans un coalescent.

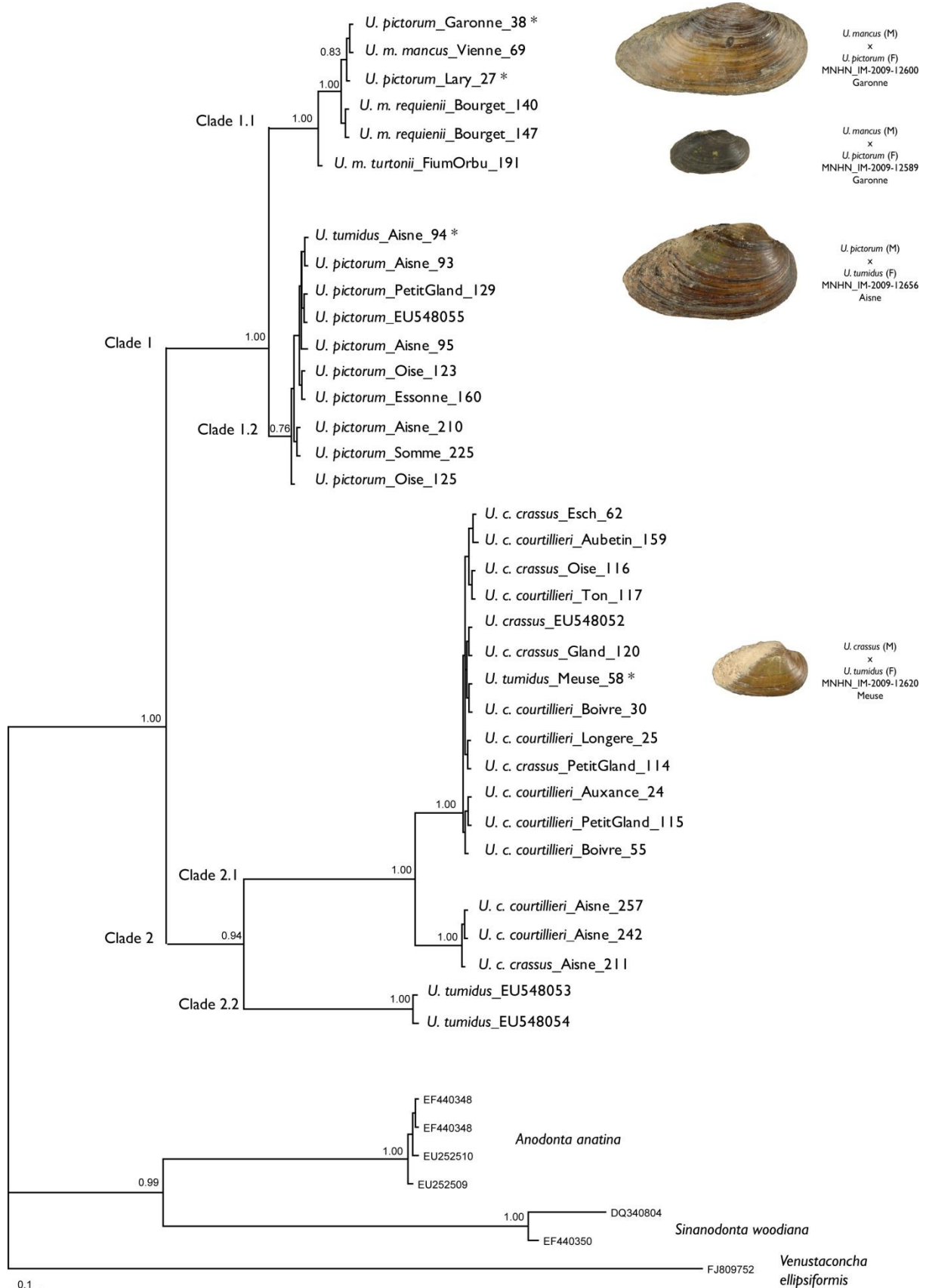


Figure 24 : phylogénie obtenue à partir de l'ADNmt mâle des différentes espèces du genre *Unio*. Les probabilités postérieures de l'analyse bayésienne sont indiquées au-dessus des nœuds. Les spécimens hybrides sont indiqués par un astérisque.

II.2 ESSAI D'ANALYSE MORPHOMETRIQUE

La taxonomie des espèces de naïades est submergée d'une pléthore de noms. Locard (1893) reconnaît 900 espèces de bivalves dulçaquicoles en France. Les excès de la Nouvelle Ecole ont été largement critiqués, mais cette abondance de noms reflète en partie la variabilité morphologique des bivalves, bien documentée depuis (ex. Ortmann 1920 ; Agrell 1948 ; Nagel 1992 ; Watters 1994 ; Zieritz & Aldridge 2009 ; Zieritz *et al.* 2010). Selon Ortmann (1920), les individus situés dans les zones lotiques tendent à être plus fins que ceux situés dans les secteurs lenticules. Mes observations confirment cette tendance : les spécimens d'*U. pictorum* du Lac de Brindos (**Planche 5, G-I**) ou d'*U. mancus* des étangs de Beaufort (**Planche 6, F-G**) et de la Gravière (**Planche 6, A**) sont notablement plus grands et plus larges que ceux collectés dans les rivières. Preston *et al.* (2010) montrent que la variabilité morphologique de *M. margaritifera* est liée au pH. Zieritz *et al.* (2010) ne parviennent pas à corrélérer les différences morphologiques au sein d'*U. pictorum* sur la Tamise à des particularités génétiques. Par contre, les analyses génétiques que nous avons effectuées sur les spécimens du lac du Bourget, morphologiquement homologues, ont montré qu'ils appartenaient soit à *U. mancus*, soit à *U. pictorum* (Prié *et al.* 2012).

Les critères de détermination des espèces sont essentiellement basés sur la forme générale des valves et de la dent cardinale. Si ces critères permettent généralement, avec un peu d'habitude, de déterminer la plupart des échantillons collectés, de nombreux spécimens présentent des formes atypiques et les cas de convergence de forme peuvent induire en erreur les meilleurs spécialistes.

J'illustre dans les planches qui suivent la variabilité morphologique des spécimens dont les séquences ont été analysées lors de ce travail. La variabilité de *M. margaritifera* n'est pas illustrée, aucune étude spécifique n'ayant été réalisée par mes soins pour cette espèce qui a déjà fait l'objet de nombreuses publications. Je présente ensuite les résultats d'une analyse de contours visant à distinguer deux clades moléculaires chez *U. crassus*.

II.2.1 Illustration de la variabilité morphologique

La variabilité morphologique des taxons valides des genres *Unio*, *Potomida* et *Margaritifera* (excepté *M. margaritifera* qui n'a pas été étudiée dans le cadre de ce travail) est présentée dans les planches qui suivent. Pour chaque spécimen est indiqué le numéro d'inventaire MNHN, qui commence par IM- pour les spécimens collectés par mes soins, et par MNHN pour le matériel type (sauf pour *M. auricularia* puisque les spécimens illustrés ont été photographiés vivants et retournés au cours d'eau) ; puis le cours d'eau de provenance ; et pour les affluents de fleuves le fleuve collecteur entre parenthèses.

PLANCHE I (page suivante) : Variabilité morphologique de *M. auricularia*. A-E : Charente (C-E : juvéniles) ; F-I : Vienne (Loire) (H, I : juvéniles) ; J-L : Luy (Adour) (K : subadulte, L : juvénile) ; M : Oise (Seine) ; N : Save (Garonne) ; O : *M. margaritifera* adulte, Arn. Les spécimens de la Vienne font l'objet d'un suivi et portent un marquage individuel. Tous ces spécimens ont été photographiés vivants sauf celui de l'Oise.

M. auricularia présente des formes différentes selon les bassins versants : les spécimens de Charente sont plus petits et plus auriculés (A-E) que ceux de la Vienne (F-I). Ils présentent en sus une teinte légèrement rosée. Ceux du Luy sont plus allongés, leur coquille est généralement très érodée (J-L). Ceux de la Save sont caractérisés par leur grande taille (N). *M. margaritifera* adulte ressemble aux juvéniles de *M. auricularia*, mais les deux espèces ne s dans les mêmes milieux.

PLANCHE 2 : Variabilité morphologique de *Potomida littoralis* et comparaison avec *Unio crassus*. A : *U. crassus* IM-2009-12563, Vienne (Loire) ; B : *P. littoralis* IM-2009-12565, Vienne (Loire) ; C : *U. crassus* IM-2009-12567, Vienne (Loire) ; D : *U. crassus* IM-2009-12568, Clain (Loire) ; E : *P. littoralis* IM-2009-12585, Vonne (Loire) ; F : *P. littoralis* IM-2009-12622, Charente ; G-I : *P. littoralis* IM-2009-12612, IM-2009-12613, IM-2009-12614, Ardèche (Rhône) ; J-L : *P. littoralis* IM-2009-12626, IM-2009-12627, IM-2009-12628, Save (Garonne).

P. littoralis présente également des formes et des tailles très variables, avec des individus au contour très arrondi (E, J, L). Les spécimens de l'Ardèche sont remarquablement grands et très auriculés (G-I). Certaines formes d'*U. crassus* (A, C, D) sont difficiles à distinguer des jeunes spécimens de *P. littoralis*, en particulier quand ils sont vivants et que les caractéristiques internes ne sont pas visibles.

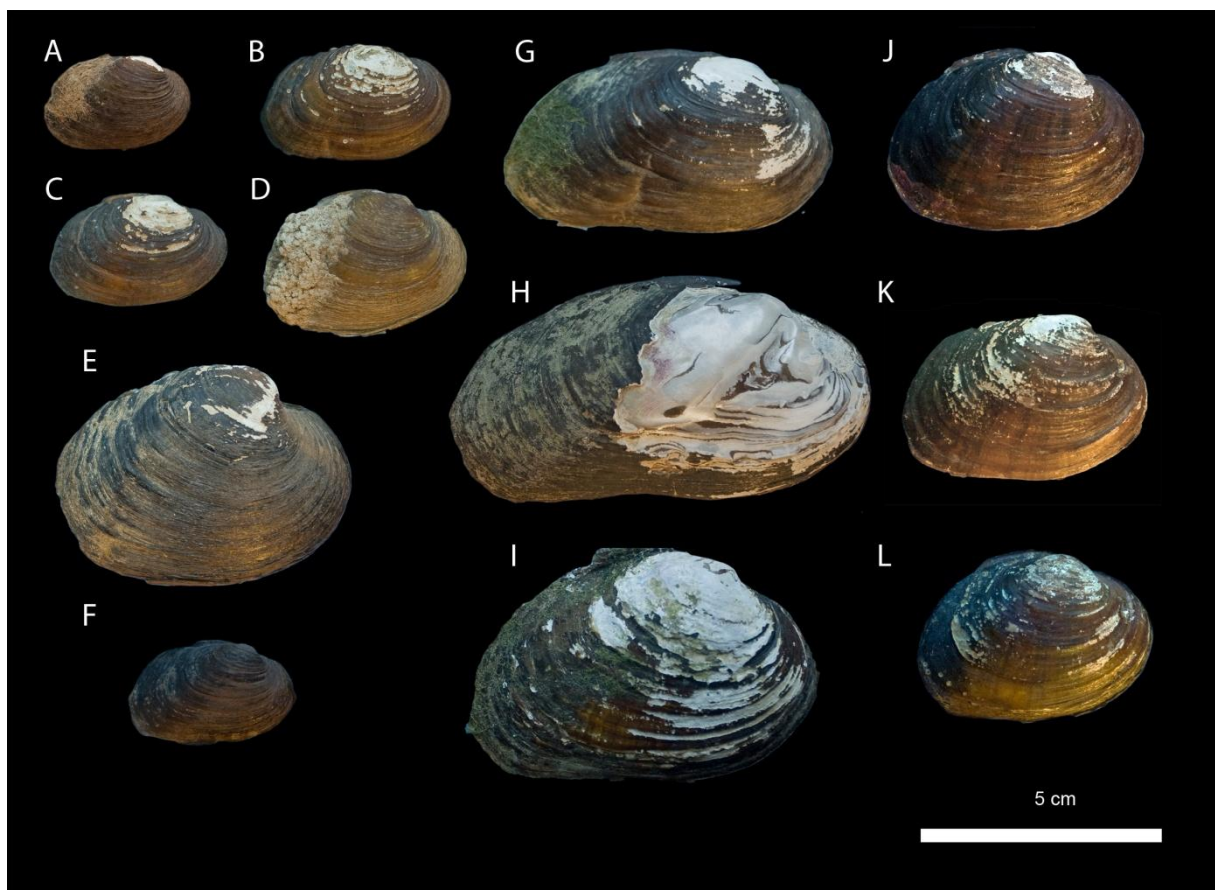


Planche I : *M. auricularia*

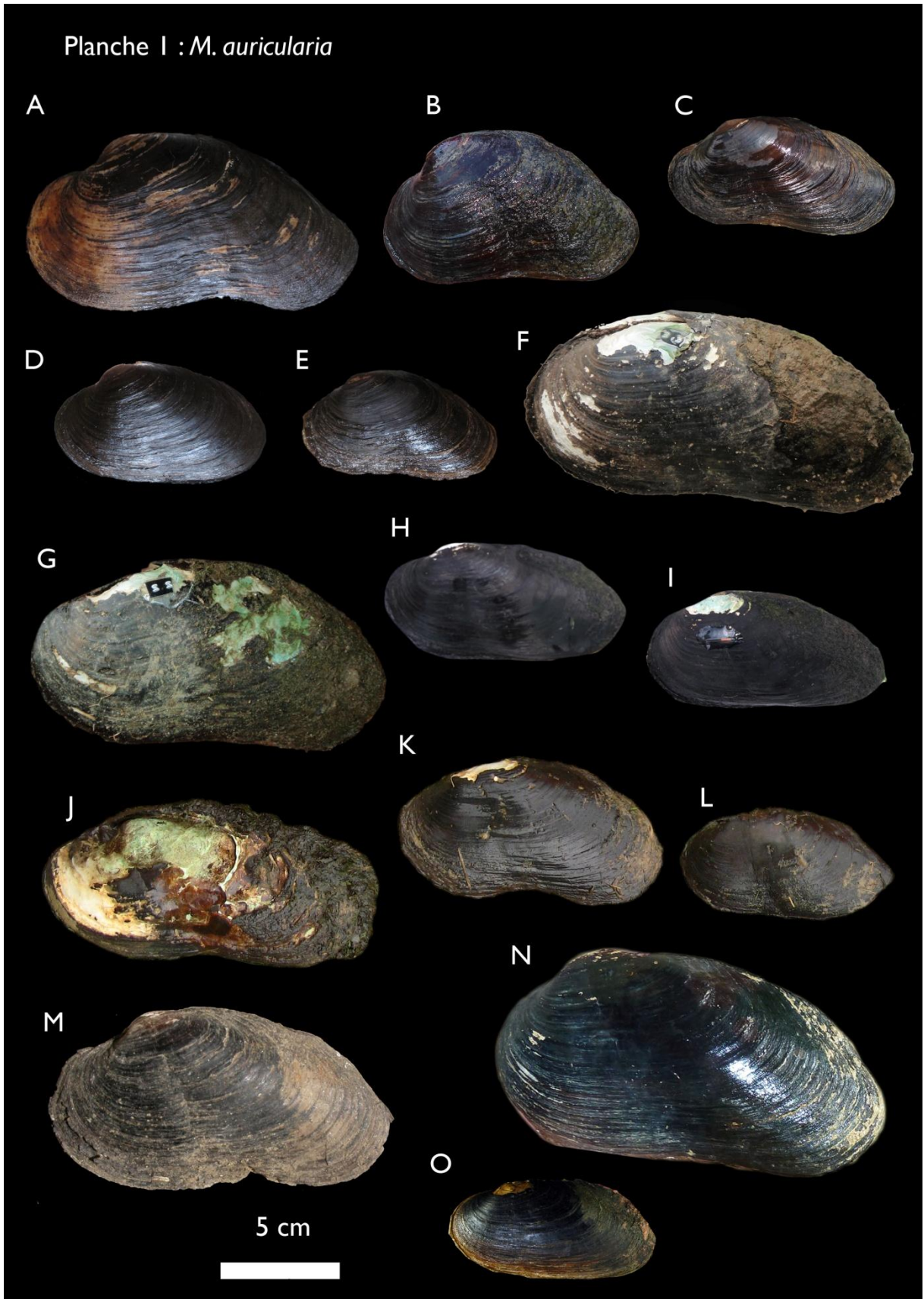


PLANCHE 3 & 4 : Variabilité morphologique d'*U. crassus*. L'approche moléculaire permet de distinguer deux clades au sein d'*Unio crassus*, attribuables à *U. c. courtillieri* et *U. c. crassus* (ARTICLE 6). Les analyses morphométriques n'ont pas permis de distinguer ces deux clades. La population de la Vienne, qui ne comporte que des *U. c. courtillieri*, se distingue morphologiquement des populations de la Seine et du Rhin. En revanche, les *U. c. courtillieri* de la Seine ne présentent pas de différences morphologiques significatives avec les *U. c. crassus* du même bassin versant. La forme particulière des spécimens de la Vienne n'est donc pas liée aux différences génétiques observées.

PLANCHE 3 : A : *U. c. crassus* IM-2009-12584, Esch (Rhin) ; B : *U. c. crassus* IM-2009-12625, Esch (Rhin) ; C : *U. c. crassus* IM-2009-17840, Thon (Seine) ; D : *U. c. crassus* IM-2009-17841, Thon (Seine) ; E : *U. c. crassus* IM-2009-12681, Gland (Seine) ; F : *U. c. crassus* IM-2009-12682, Gland (Seine) ; G : *U. c. crassus* IM-2009-17846, Petit Gland (Seine) ; H : *U. c. crassus* IM-2009-17845, Petit Gland (Seine) ; I : *U. c. crassus* IM-2009-17768, Petit Gland (Seine) ; J : *U. c. crassus* IM-2009-17847, Petit Gland (Seine) ; K : *U. c. crassus* IM-2009-17843, Petit Gland (Seine) ; L : *U. c. crassus* IM-2009-12676, Petit Gland (Seine) ; M : *U. c. crassus* IM-2009-12678, Oise (Seine) ; N : *U. c. crassus* IM-2009-17767, Aisne (Seine) ; O : *U. c. crassus* IM-2009-17804, Aisne (Seine) ; P : *U. c. crassus* IM-2009-17795, Aisne (Seine) ; Q : *U. c. crassus* IM-2009-17791, Aisne (Seine) ; R : *U. c. crassus* IM-2009-17759, Aisne (Seine) ; S : *U. c. crassus* IM-2009-17794, Aisne (Seine) ; T : *U. c. crassus* IM-2009-17793, Aisne (Seine) ; U : *U. c. crassus* IM-2009-17760, Aisne (Seine) ; V : *U. c. crassus* IM-2009-17797, Aisne (Seine) ; W : *U. c. crassus* IM-2009-17753, Aisne (Seine).

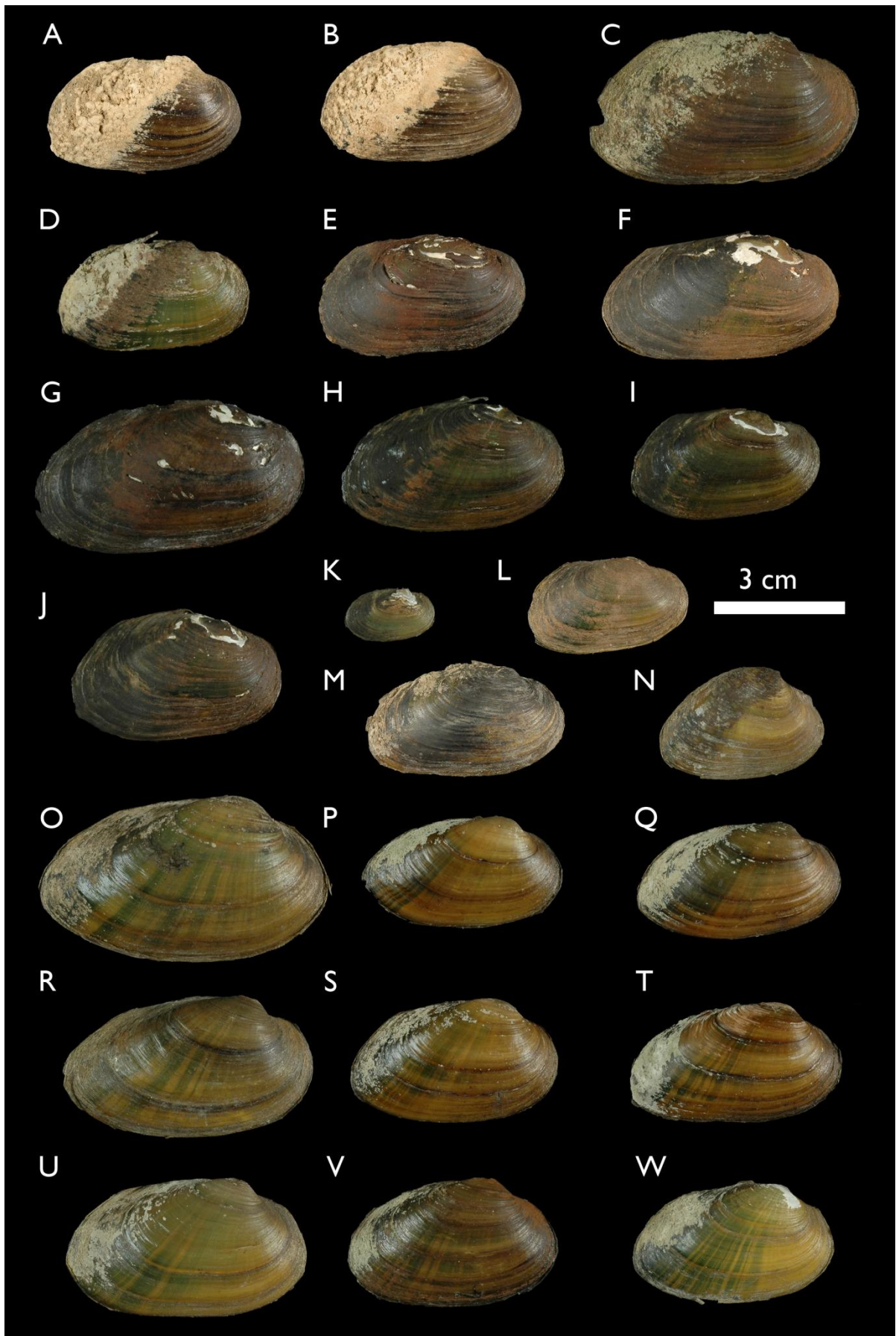


PLANCHE 4 : A : *U. c. courtillieri* IM-2009-12566, Vienne (Loire) ; B : *U. c. courtillieri* IM-2009-12564, Vienne (Loire) ; C : *U. c. courtillieri* IM-2009-12593, Vienne (Loire) ; D : *U. c. courtillieri* IM-2009-12595, Vienne (Loire) ; E : *U. c. courtillieri* IM-2009-12616, Vienne (Loire) ; F : *U. c. courtillieri* IM-2009-12629, Vienne (Loire) ; G : *U. c. courtillieri* IM-2009-12592, Boivre (Loire) ; H : *U. c. courtillieri* IM-2009-12617, Boivre (Loire) ; I : *U. c. courtillieri* IM-2009-12590, Palais (Loire) ; J : *U. c. courtillieri* IM-2009-12587, Longère (Loire) ; K : *U. c. courtillieri* IM-2009-17848 Petit Gland (Seine) ; L : *U. c. courtillieri* IM-2009-12677 Petit Gland (Seine) ; M : *U. c. courtillieri* IM-2009-17769 Petit Gland (Seine) ; N : *U. c. courtillieri* IM-2009-12680 Petit Gland (Seine) ; O : *U. c. courtillieri* IM-2009-17761, Aisne (Seine) ; P : *U. c. courtillieri* IM-2009-17805, Aisne (Seine) ; Q : *U. c. courtillieri* IM-2009-17796, Aisne (Seine) ; R : *U. c. courtillieri* IM-2009-17792, Aisne (Seine) ; S : *U. c. courtillieri* IM-2009-17763, Aisne (Seine) ; T : *U. c. courtillieri* IM-2009-17754, Aisne (Seine) ; U : *U. c. courtillieri* IM-2009-17811, Therain (Seine).

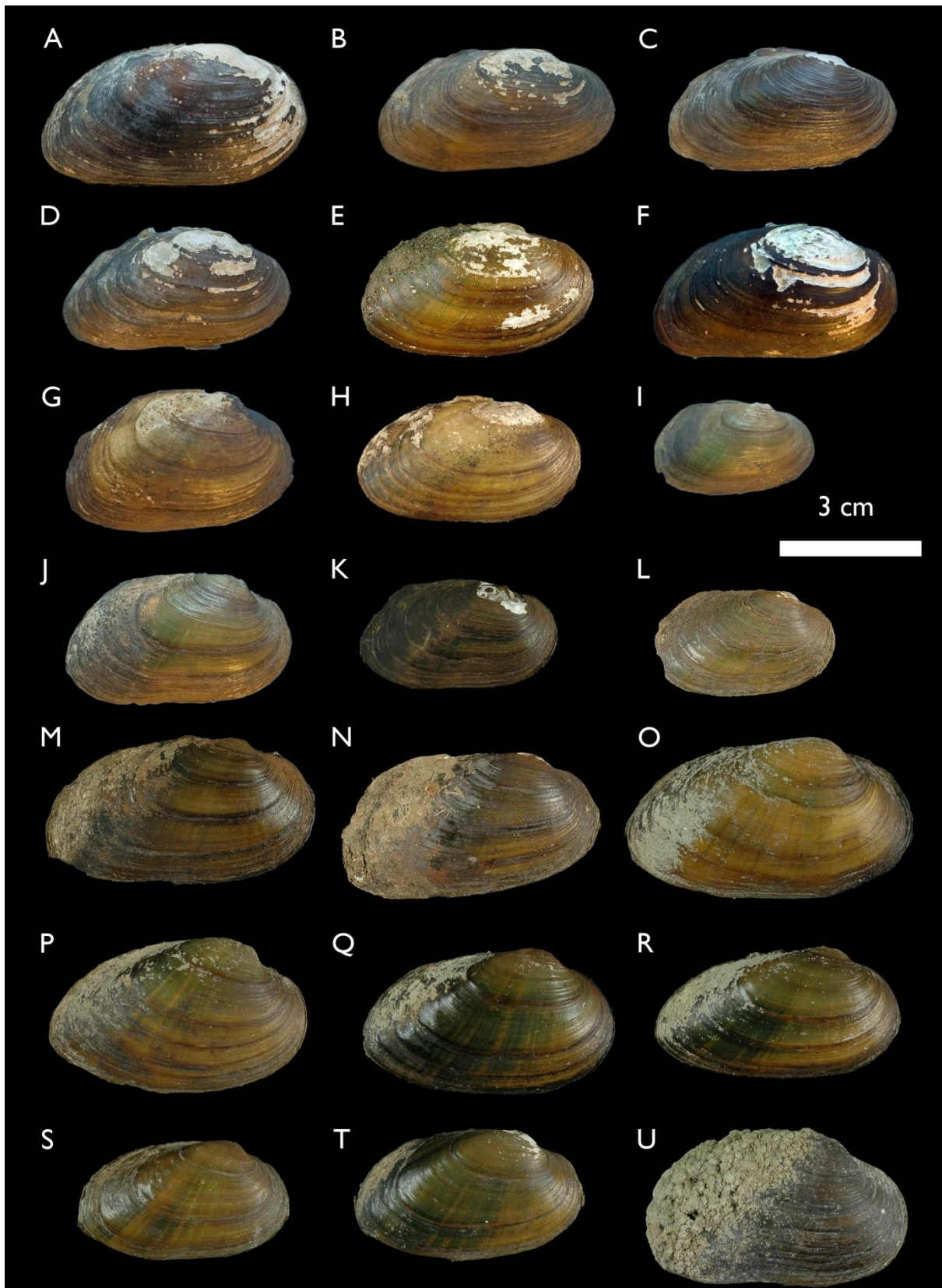
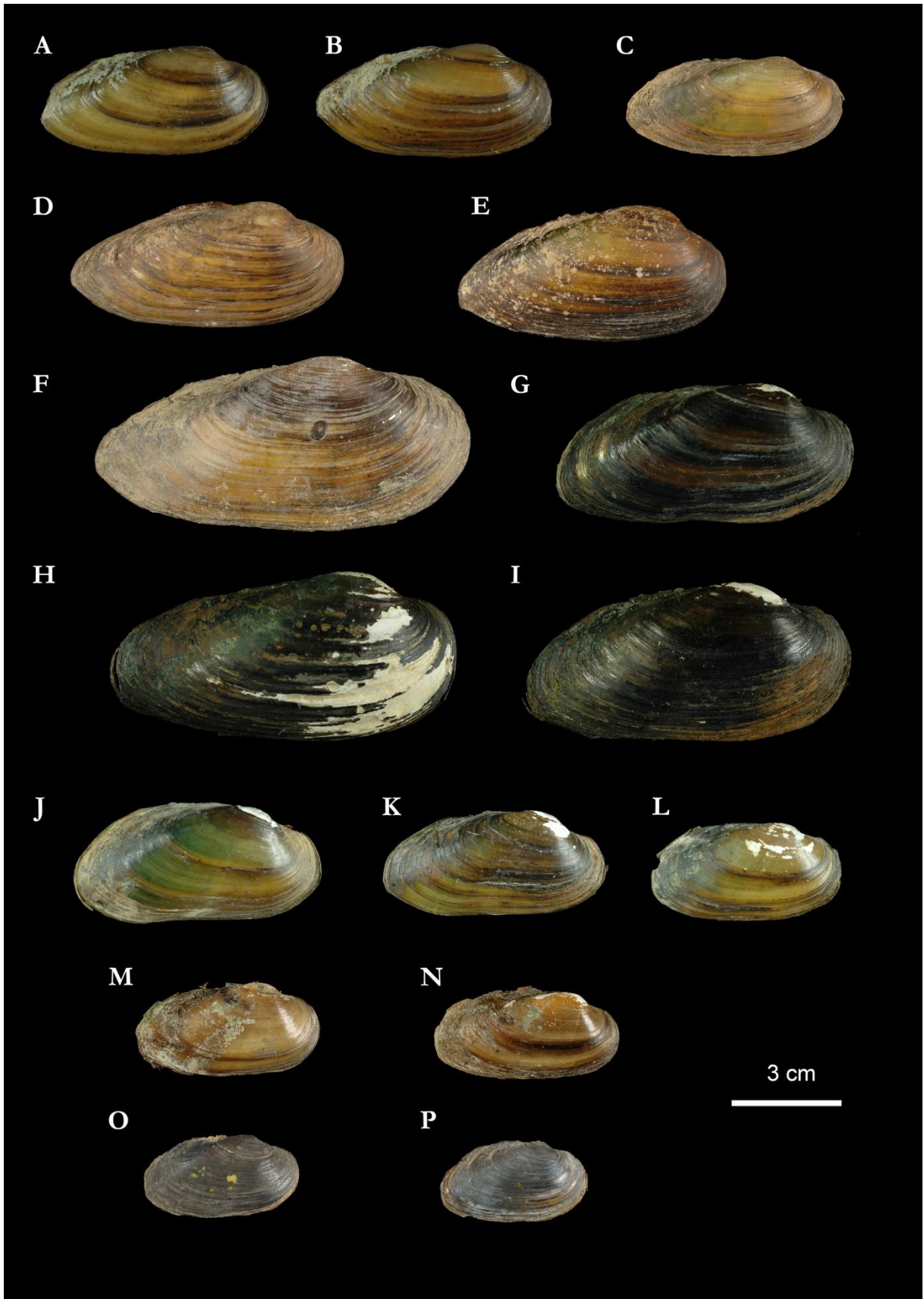


PLANCHE 5 : Variabilité morphologique d'*U. pictorum*. *U. pictorum* a généralement une forme élancée, relativement homogène dans le nord-est de la France (A-C). Cette forme typique n'est pas confondable avec *U. manicus*. Toutefois, les spécimens collectés dans le sud-ouest (Lac de Brindos, G-I ; Gave de Pau, J-L ; Loutz, un affluent de l'Adour, O, P) et dans le Lac du Bourget (M, N) sont très différents des formes illustrées par exemple par Killeen (2004) et se rapprochent de la variabilité observée chez *U. manicus*. Certains individus de l'Aisne et de la Meuse présentent une convergence de forme frappante avec *U. tumidus*, qui se trouve en abondance sur le même site (D-F).



PLANCHES 6-8 : variabilité morphologique d'*U. mancus*. *U. mancus* est probablement l'espèce la plus variable. L'illustration des spécimens collectés sur les stations-types des différentes sous-espèces d'*U. mancus* (Prié, 2012) explique les noms introduits par les auteurs classiques (par exemple *U. m. aleronii* et *U. m. moquinianus*, qui présentent des morphes très caractéristiques). Les spécimens attribués à *U. mancus* n'ont jamais la forme typique d'*U. pictorum* (voir PLANCHE 5, A-C).

PLANCHE 6 : variabilité morphologique d'*U. mancus mancus*. A : lectotype MNHN 24632, Drée (Loire) ; B : IM-2009-12631, Vienne ; C : IM-2009-12668, Vonne ; D : IM-2009-12591, Boivre ; E : IM-2009-12717, Né (Charente) ; F : IM-2009-21307, Etang de Beaufort (Bretagne) ; G : IM-2009-21302, Etang de Beaufort (Bretagne) ; H : IM-2009-17788, Ellé (Bretagne) ; I : IM-2009-17786, Ellé (Bretagne) ; J : IM-2009-12599, Loutz ; K : IM-2009-12598, Loutz ; L : IM-2009-17815, Basse (Perpignan) ; M : IM-2009-17821, Basse (Perpignan) ; N : IM-2009-17818, Basse (Perpignan)

Planche VI: *U. m. mancus*

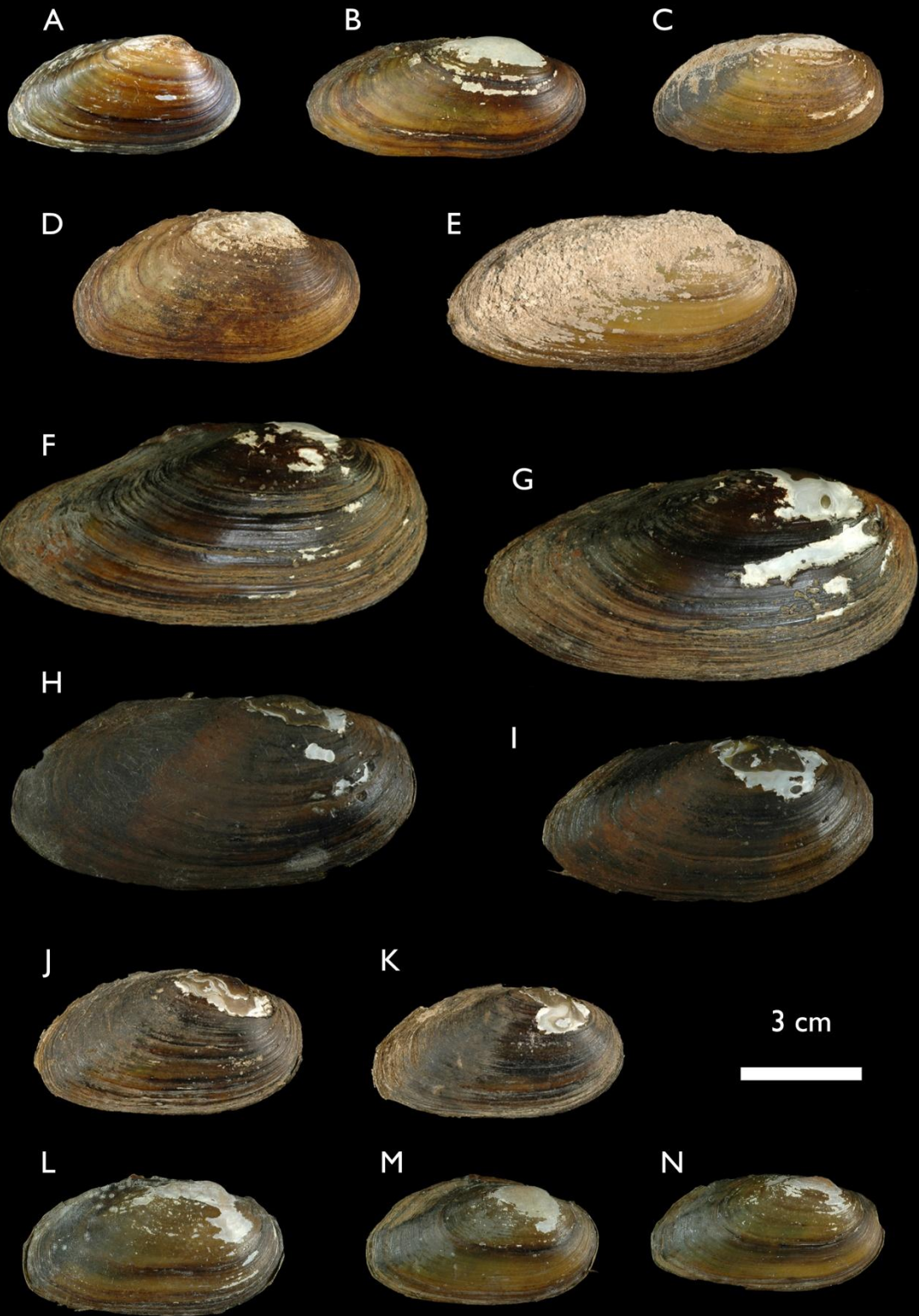


PLANCHE 7 : variabilité morphologique d'*U. manicus requienii*. A : IM-2009-17775, Etang de la Gravière (Rhône) ; B : IM-2009-12605, Rhône ; C : IM-2009-12570, Lamalou (Hérault) ; D : IM-2009-12569, Hérault ; E : MNHN 22139, syntype, lac du Bourget (Rhône) ; F : MNHN 22139, syntype, lac du Bourget (Rhône) ; G : MNHN 22139, syntype, lac du Bourget (Rhône) ; H : MNHN 22139, syntype, lac du Bourget (Rhône) ; I : IM-2009-12702, lac du Bourget (Rhône) ; J : IM-2009-12709, lac du Bourget (Rhône) ; K : IM-2009-12704, lac du Bourget (Rhône) ; L : IM-2009-17806, Suran (Rhône) ; M : IM-2009-17803, Aisne (Seine) ; N : IM-2009-17814, Petit Morin (Seine) ; O : IM-2009-21228, Ourcq (Seine) ; P : IM-2009-21231, Ourcq (Seine)

Planche VII : *U. m. requienii*

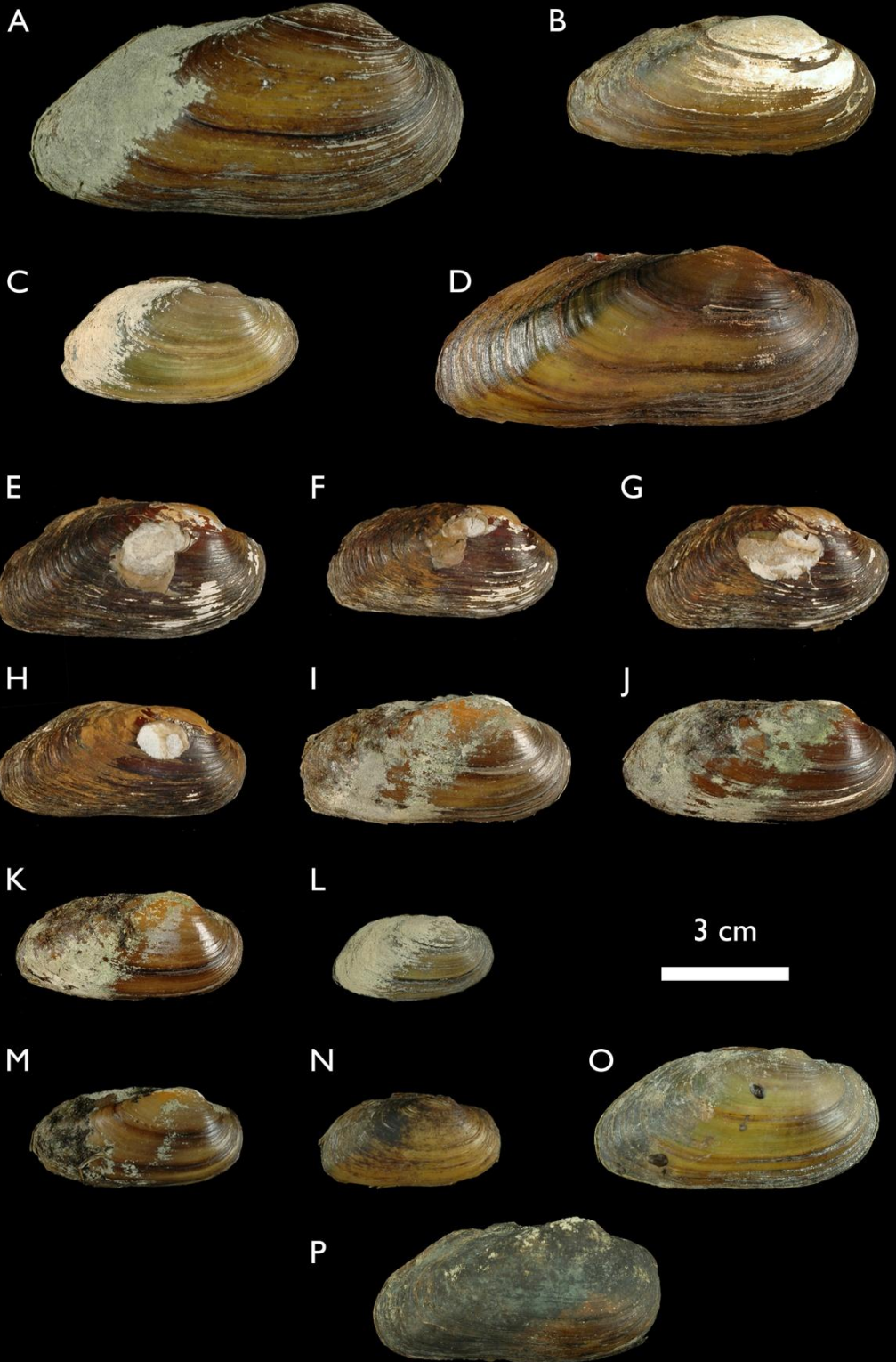
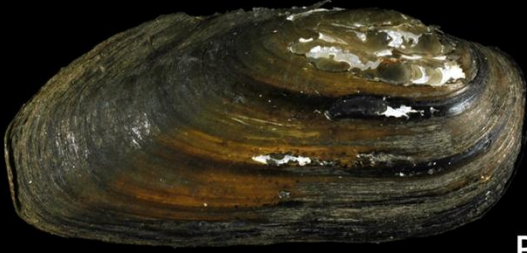


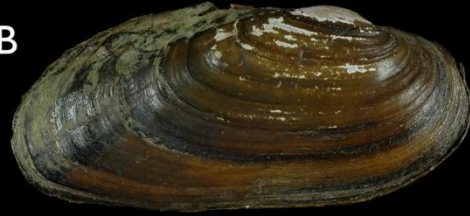
PLANCHE 8 : variabilité d'*U. m. turtonii*. A : IM-2009-12736, Fium Orbu (Corse) ; B : IM-2009-12749, Fium Orbu (Corse) ; C : IM-2009-12735, Fium Orbu (Corse) ; D : IM-2009-17784, Golo (Corse) ; E : IM-2009-12759, Tavignanu (Corse) ; F : IM-2009-12758, Tavignanu (Corse) ; G : IM-2009-12579, Argens (Provence) ; H : IM-2009-12571, Argens (Provence)

Planche VIII : *U. m. turtonii*

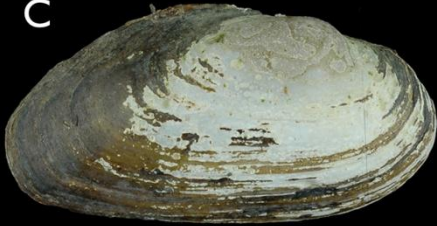
A



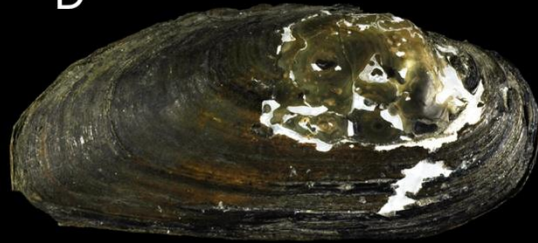
B



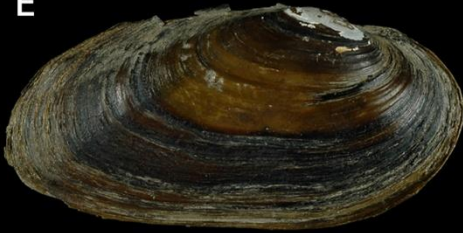
C



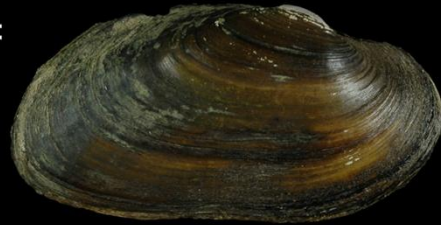
D



E



F



G



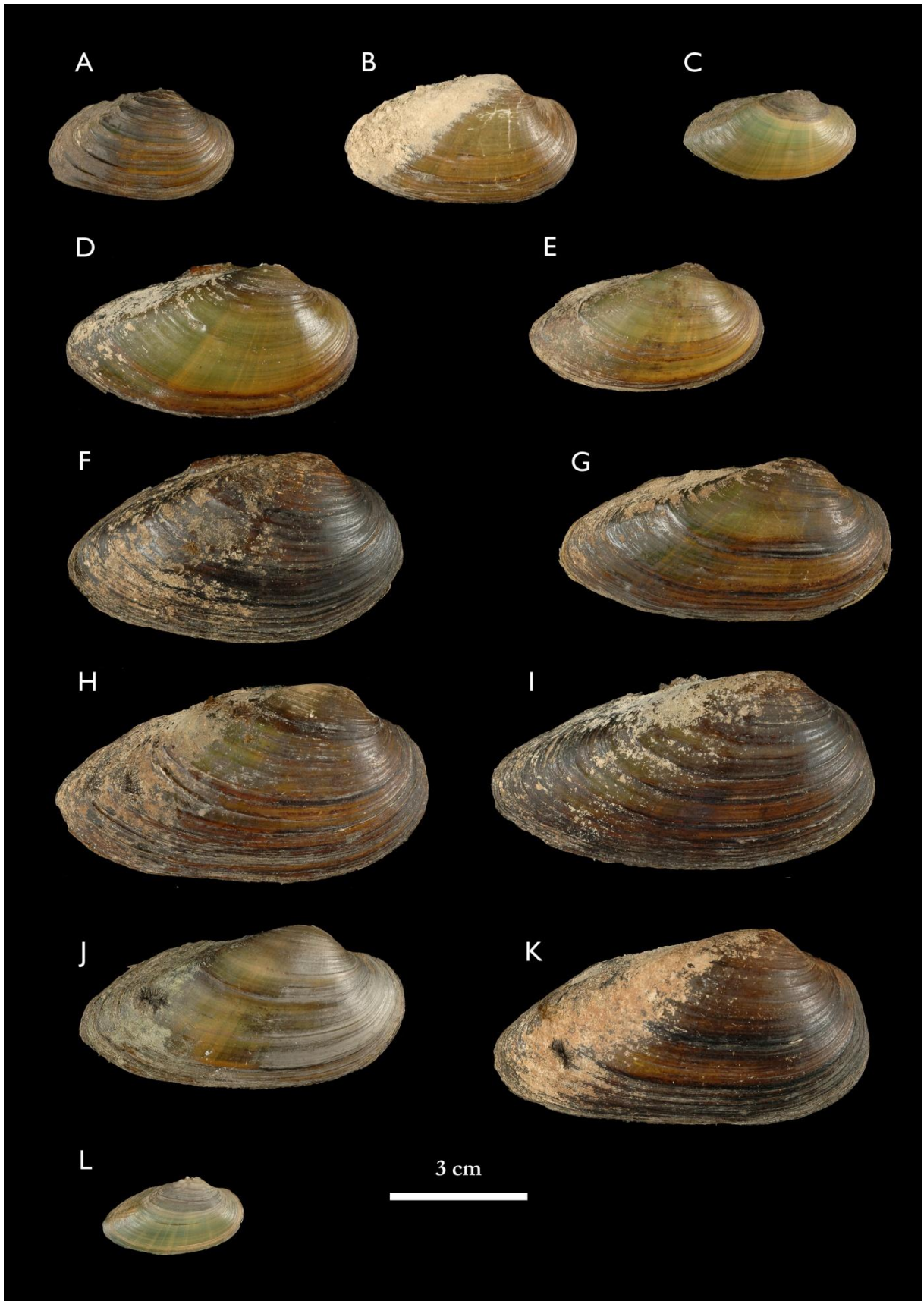
H



3 cm



PLANCHE 9 : Variabilité morphologique d'*U. tumidus*. A : IM-2009-12575, Meuse ; B : IM-2009-12620, Meuse ; C : IM-2009-12683, Oise (Seine) ; D : IM-2009-12609, Aisne (Seine) ; E : IM-2009-12664, Aisne (Seine) ; F : IM-2009-12608, Aisne (Seine) ; G : IM-2009-12669, Aisne (Seine) ; H : M-2009-12656, Aisne (Seine) ; I : IM-2009-12607, Aisne (Seine) ; J : IM-2009-12606, Gravon (Seine) ; K : IM-2009-12660, Aisne (Seine) ; L : IM-2009-12698, Saône (Rhône).



II.2.2 Test de la distinction des 2 clades moléculaires d'*Unio crassus* par une approche morphométrique et biométrique

II.2.2.1 La difficile biométrie des coquilles de bivalves

Bien que la tête soit absente, l'organisation morphologique des bivalves suit un plan bilatéral antéro-postérieur (Fig. 25).

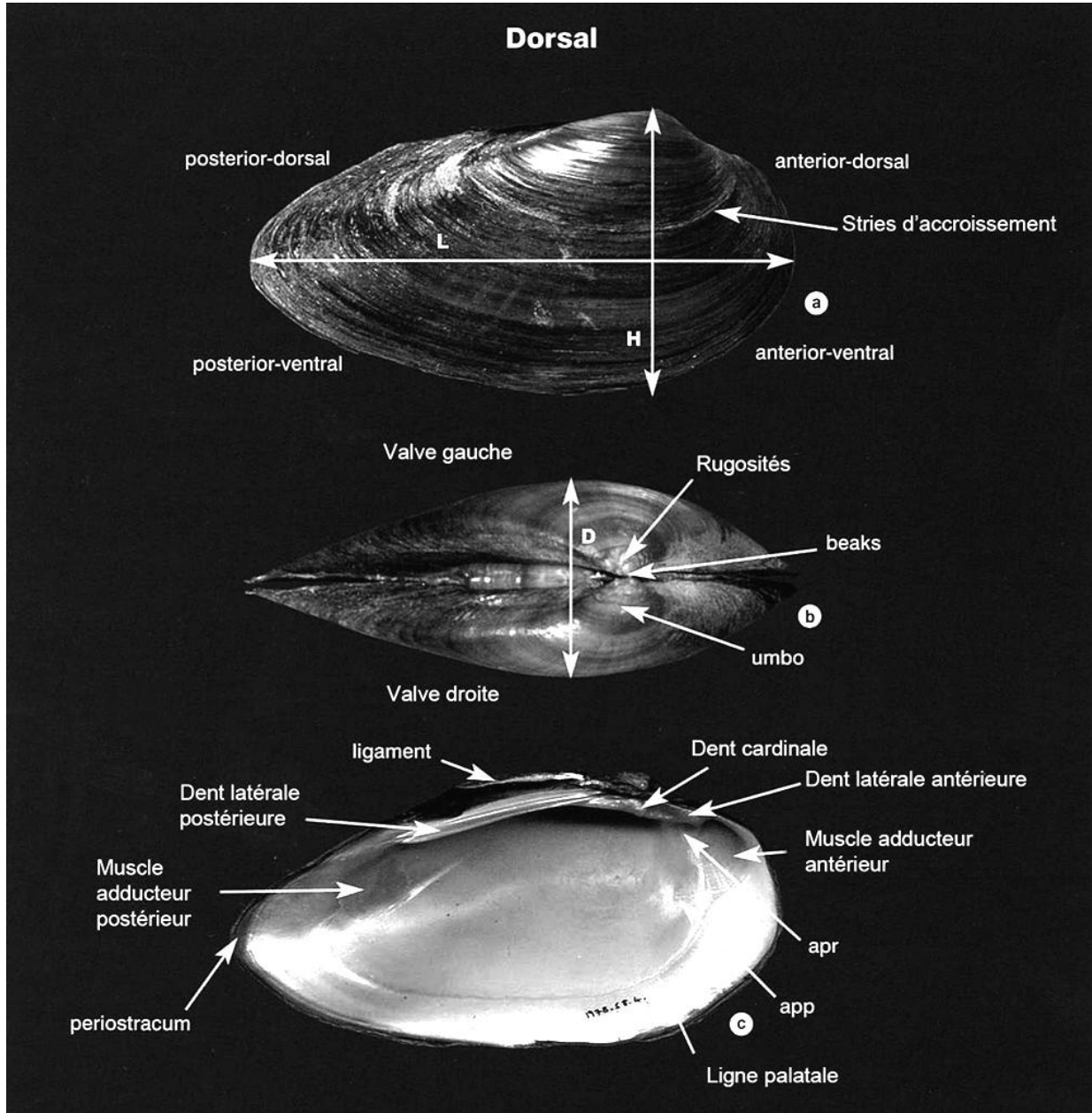


Figure 25 : topographie des bivalves. A : vue externe de la valve droite ; b : vue du dessus ; c : vue interne de la valve gauche. D'après Killeen et al. (2004).

La détermination des naïades sur le terrain fait appel à des caractères externes (excroissances au niveau de l'umbo et forme globale de la coquille), mais surtout à des caractères internes (forme de la dent cardinale, position des muscles adducteurs, sillon palléal...). Or ces caractères internes ne sont pas accessibles chez les animaux vivants. L'umbo est bien souvent érodé et ses excroissances ne sont généralement plus visibles chez les animaux adultes. Restent donc la forme de la coquille, qui est difficilement mesurable et fait appel au " Jizz "⁹ du naturaliste. La détermination sur le terrain est donc rendue difficile, notamment pour les espèces présentant des enjeux de conservation ou dans tout autre cas où les individus ne peuvent être euthanasiés.

Le recours au Jizz n'étant pas satisfaisant, j'ai testé l'applicabilité de mesures biométriques pour discriminer les différents taxons. La principale difficulté pour réaliser la biométrie des coquilles de naïades tient au peu de points homologues, notamment à l'extérieur des coquilles. S'ajoutent la croissance continue, la grande variabilité de forme et l'absence d'informations de genre (il n'y a pas de dimorphisme sexuel chez les Unionidae).

Killeen *et al.* (2004) proposent une méthode pour la biométrie des coquilles : la **longueur** est définie comme la plus grande distance entre la partie antérieure et la partie postérieure de la coquille (Fig. 25a, L) ; la **hauteur** est définie comme la plus grande mesure à angle droit de la longueur (Fig. 25a, H) ; le **diamètre** comme la plus grande mesure entre les valves (Fig. 25b, D). Toutefois, la grande variabilité de forme des contours rend difficile la standardisation de ces mesures. La plus grande longueur par exemple peut présenter un angle radicalement différent selon les spécimens. En conséquence, la hauteur ne sera pas mesurée au même endroit (Fig. 26 A-C). De même, le diamètre sera souvent mesuré au niveau de l'umbo, mais dans certain cas la plus grande distance se trouvera très en arrière de l'animal. On ne mesurera donc pas la même partie de l'animal d'un spécimen à l'autre, ce qui met en doute la pertinence de ces mesures supposées standard.

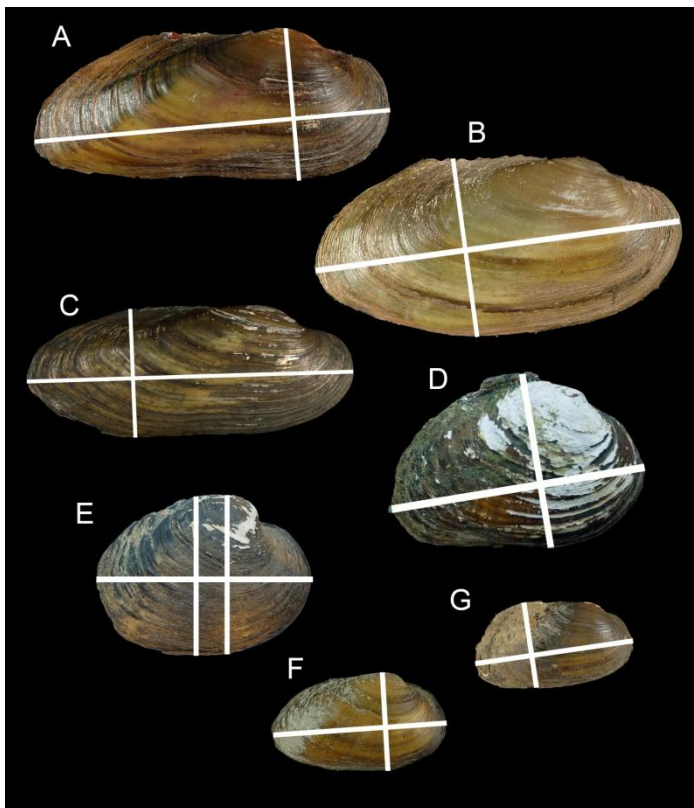
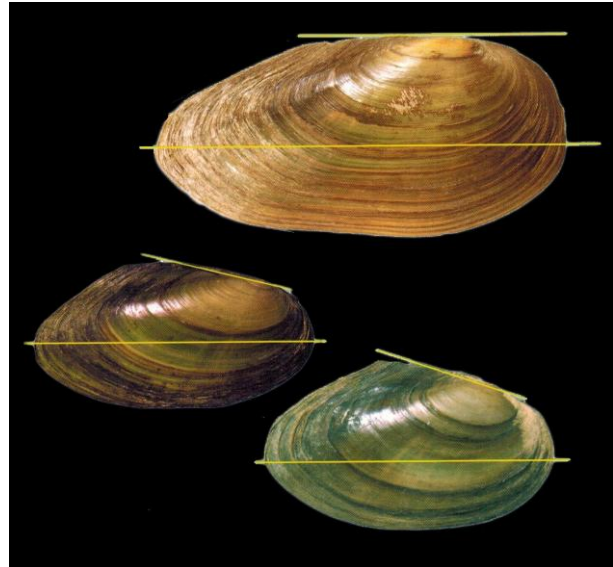


Figure 26 : la difficile standardisation des mesures. La longueur est définie comme la plus grande mesure antéro-postérieure ; la hauteur comme la plus grande mesure perpendiculaire à l'axe de mesure de la longueur. Pour le spécimen A, la hauteur est mesurée au niveau de l'umbo. Pour les spécimens B & C, elle se trouve très en arrière de la coquille. On ne mesure donc pas la même partie de l'animal, ce qui rend difficile les comparaisons. Dans le cas de coquilles arrondies (D & E), les axes peuvent être très différents. Pour le spécimen E, deux mesures identiques peuvent être utilisées, qui ne passent pas au même endroit de la coquille.

Pour la détermination des Anodontinae, plusieurs auteurs proposent de mesurer l'angle entre la longueur et la tangente à la partie sommitale, ou même la tangente à la partie extérieure de la coquille (Fig. 27). Le positionnement de la tangente à une coquille globalement ovale est cependant très subjectif.

⁹ Le " Jizz " est un terme employé par les naturalistes, qui ferait référence au GISS, " General Impression of Size and Shape ", employé par les pilotes de chasse. Il désigne une impression générale, difficilement explicable ou objectivable.

Figure 28 : l'utilisation de l'angle entre la tangente au niveau de l'umbo et la plus grande longueur (d'après Killeen *et al.* 2004). Ces schémas restent très théoriques et difficilement applicables à toutes les coquilles, qui présentent des formes très variables.



L'un des principaux critères utilisés par les experts pour déterminer les bivalves sur le terrain est l'appréciation du contour des valves (en particulier dans le cas d'individus vivants pour lesquels les critères internes sont inaccessibles). Si la morphologie peut être trompeuse pour le naturaliste, qui ne peut que se fier à des critères appréciables sur le terrain, des analyses morphométriques plus poussées telles que les transformées de Fourier (Rohlf 1996) semblent prometteuse pour objectiver cette appréciation du contour. Elles ont été utilisées au niveau intraspécifique (Zieritz *et al.* 2010 ; Preston *et al.* 2010). J'ai donc testé ces analyses sur les deux clades mitochondriaux d'*U. crassus* (ARTICLE 6) dans l'espoir de mettre en évidence des différences morphométriques qui corroborent l'hypothèse que les différences moléculaires renvoient à des lignées évolutives divergentes.

II.2.2.2 Résultats des transformées de Fourier

II.2.2.2.1 Morphométrie

Cinq points homologues et le contour de la coquille ont été numérisés sur 86 spécimens. Les points et le contour ont été alignés sur la dent latérale et centrés sur l'umbo (Fig. 29). La projection des valeurs brutes des contours sur les axes d'une ACP (Fig. 30) ne permet pas de distinguer de groupes morphologiques correspondants aux groupes taxonomiques.

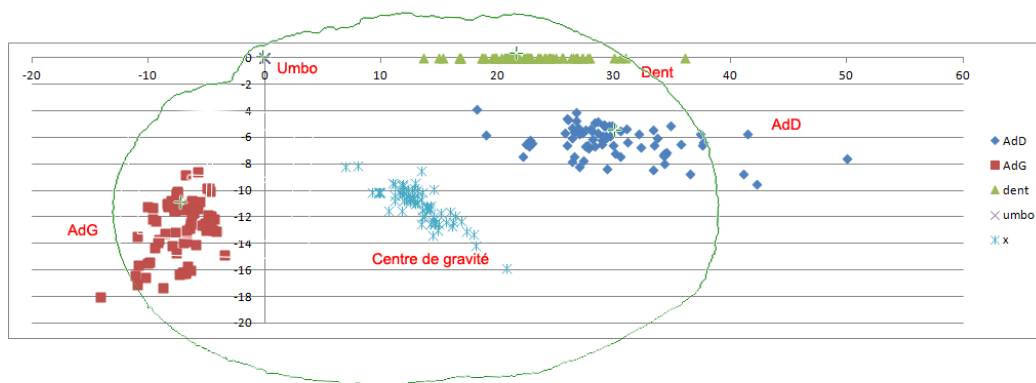


Figure 29 : projection des coordonnées des points homologues, alignés sur la dent latérale et centrés sur l'umbo. En superposition (ligne verte), un exemple de contour.

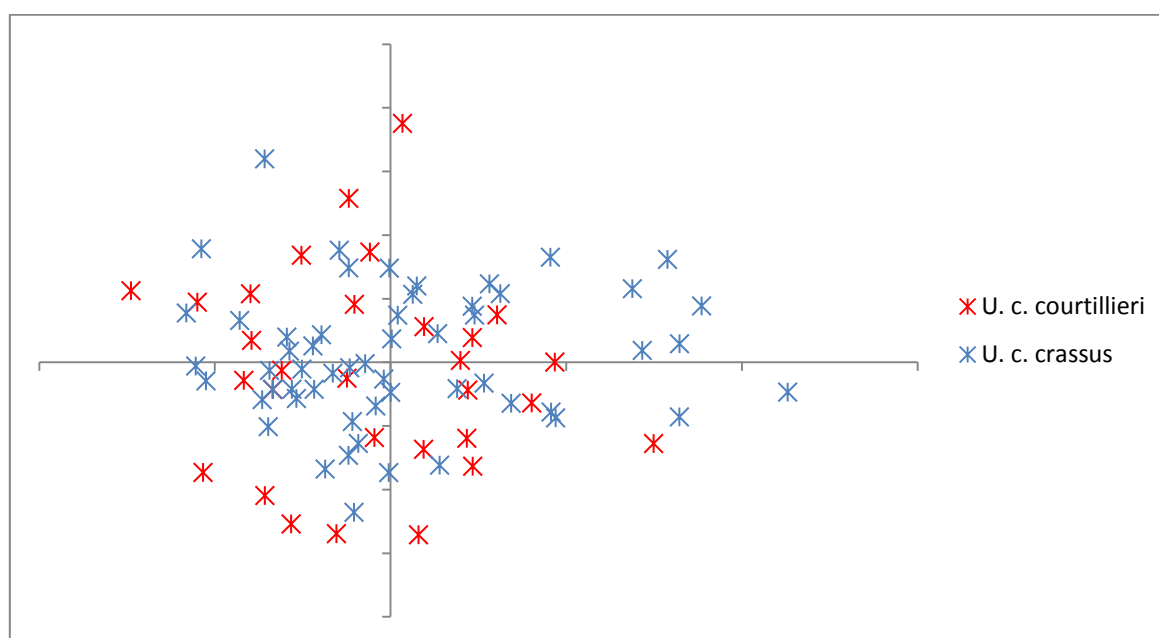


Figure 30 : projection des valeurs issues de l'analyse des contours sur les axes 1 et 2 de l'ACP. Les deux taxons se superposent complètement, l'ACP ne permet pas de distinguer deux groupes morphologiques.

Les analyses réalisées avec MClust permettent d'observer 3 groupes (Fig. 31A), mais aucun de ces groupes ne correspond aux clades observés par l'analyse moléculaire (Fig. 31B), ni à la structure hydrologique (Fig. 31C).

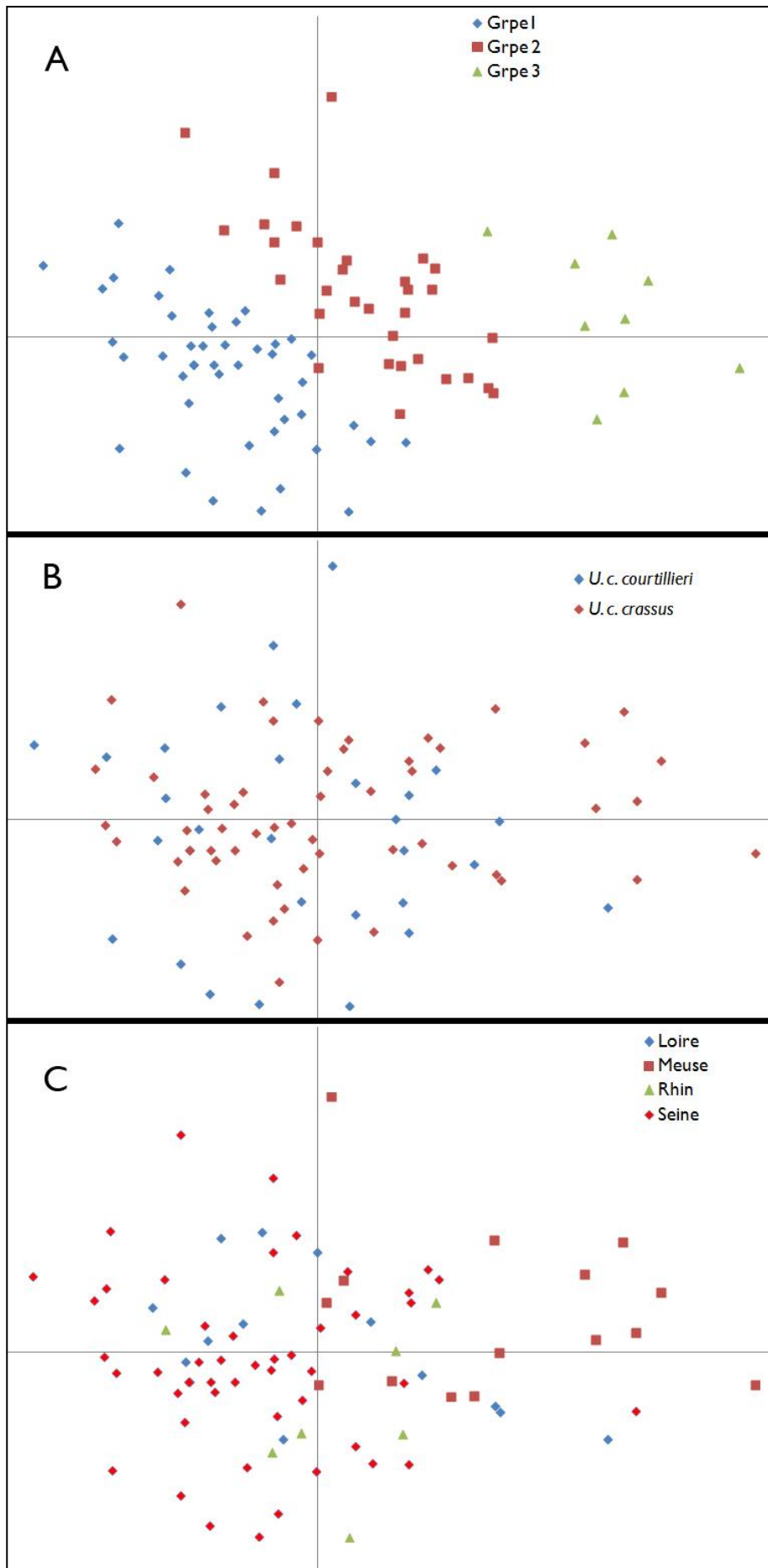


Figure 31 : Projection des individus sur l'ACP des analyses MClust. Cette analyse distingue trois groupes (A), qui ne correspondent ni aux clades moléculaires (B), ni aux bassins versants (C).

II.2.2.2.2 Biométrie

Les distances entre les points homologues ont été transformées en Log pour minimiser l'effet taille puis traitées par une ACP. Les axes 1 et 2 représentaient respectivement 86% et 9 % de la variance. Superficie et périmètre sont corrélés, longueur du ligament et épaisseur également, ce qui pourrait traduire uniquement l'effet taille.

La projection des individus sur ces axes, comme sur les axes 2 et 3, ne permet pas de distinguer deux groupes (Fig. 32).

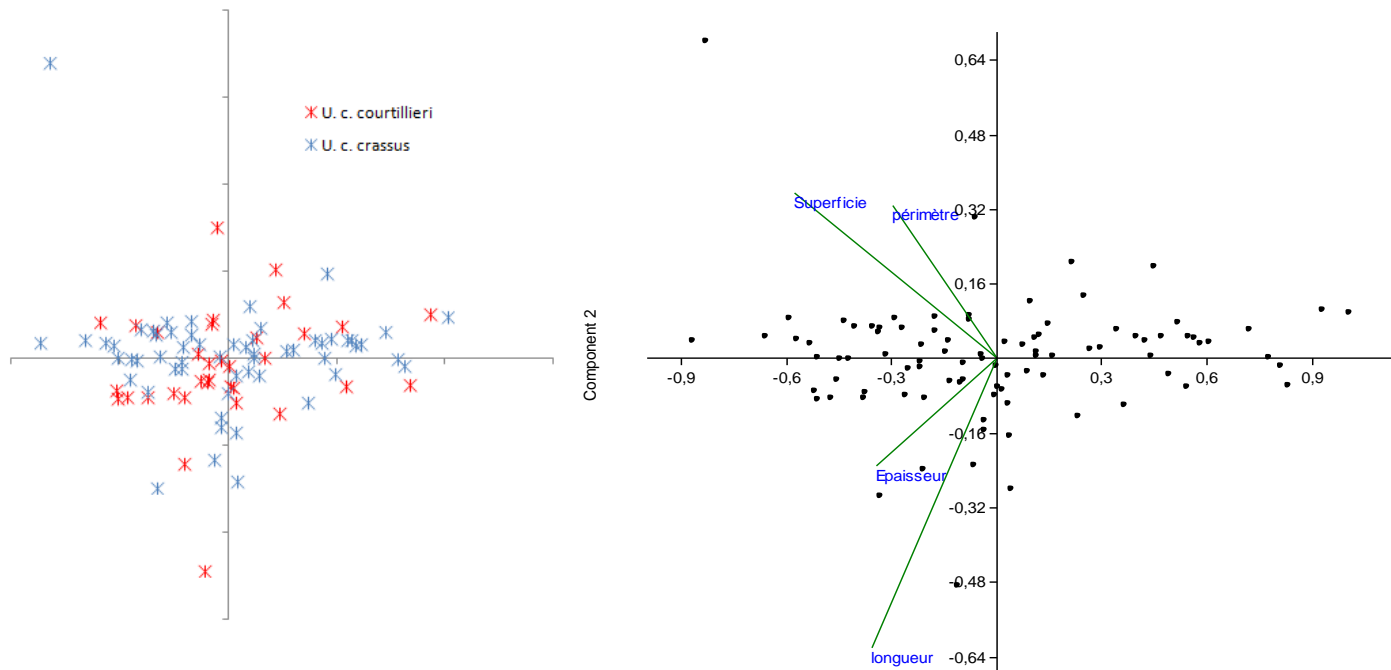


Figure 32 : projection des individus sur les axes 1 et 2 de l'ACP. A droite la projection des variables qui montre la corrélation entre superficie et périmètre d'une part, longueur du ligament et épaisseur d'autre part

II.2.2.3 Conclusion

Les différentes lignées moléculaires présentent des morphologies très variables et parfois convergentes. Si les espèces valides actuellement peuvent souvent être déterminées sur le terrain par des naturalistes expérimentés, beaucoup de spécimens sont difficilement attribuables à l'une ou l'autre de ces espèces. Les sous-espèces sont pour leur part indifférenciables et leur détermination reposera, pour *U. mancus*, sur la biogéographie. Il n'a pas été possible de différencier ni par l'analyse des contours, ni par la biométrie, les deux clades d'*Unio crassus* mis en évidence par les analyses moléculaires. Dans un cadre de taxonomie intégrative, la morphométrie ne fournit pas d'argument pour élever ces taxons au rang d'espèce. Ces deux lignées mitochondriales étant présentes en syntopie, elles sont indifférenciables sur le terrain.

Cette grande variabilité morphologique explique pourquoi la délimitation des taxons est problématique depuis 150 ans. On doit donc s'appuyer essentiellement sur les analyses génétiques pour poursuivre l'étude des naïades.

II.3 QUEL DETERMINISME DE LA DISTRIBUTION DES TAXONS ?

Le schéma théorique que je teste dans cette thèse est que les réseaux hydrographiques (pour ce qui est des bivalves, à l'échelle des fleuves côtiers) sont isolés les uns des autres et constituent autant d'îles continentales au sein desquelles les populations évoluent indépendamment. Ces lignées évolutives constitueraient alors des unités de conservation pertinentes, géographiquement délimitées. Les premiers résultats obtenus sur *U. mancus* corroboraient cette hypothèse (H1), avec toutefois le regroupement de plusieurs réseaux hydrographiques pour une même lignée et l'invalidation de nombreux taxons nominaux. Les travaux suivants ont montré qu'*U. mancus* était un cas particulier, et que la majeure partie des lignées observées ne suivent pas ce schéma théorique. Il semble que les barrières géographiques jouent globalement un rôle très faible dans la structuration génétique, comme si la capacité de dispersion des naïades était suffisante pour assurer le brassage entre les bassins-versants.

Dans cette dernière hypothèse, les naïades devraient occuper la totalité de leur optimum écologique et les limites des aires de répartition ne devraient pas, ou peu, être contraintes par les réseaux hydrographiques. Cette hypothèse nulle (H0) a été testée en modélisant les conditions écologiques favorables aux différentes espèces de naïades étudiées ici. L'idée sous-jacente était de rechercher des hydrosystèmes présentant des conditions écologiques favorables à telle ou telle espèce, mais qui ne seraient pas colonisées, ce qui pourrait traduire l'existence de barrières géographiques.

L'histoire hydrogéologique de la France permet de prédire trois grands ensembles : les bassins-versants de la Seine et de la Loire ; les bassins versants Adour-Garonne ; le bassin versant du Rhône et les fleuves côtiers méditerranéens, potentiellement en lien avec le bassin-versant du Rhin à l'amont du Rhône. Cette partition théorique générale est déjà transgressée par la structuration génétique d'*U. mancus* puisque la sous-espèce nominale est présente dans la Loire (mais pas dans la Seine), l'Adour-Garonne et les côtières méditerranéennes des Pyrénées-Orientales ; alors que la sous-espèce *U. m. requienii* vit à la fois dans les bassins-versants du Rhône et de la Seine, mais pas dans celui de la Loire (voir Fig. 3 de l'ARTICLE 3).

Nous ne sommes pas parvenus à rejeter H0 : la modélisation d'habitat réalisée pour les différentes espèces d'*Unio*, de *Margaritifera* et *P. littoralis* semble confirmer cette faible importance des barrières géographiques. Leur répartition semble suivre l'optimum écologique indépendamment de la structuration hydro-géographique.

ARTICLE 7

Prié, V., Molina, Q. & Gamboa, B. 2013. French Naiad (Bivalvia: Margaritiferidae, Unionidae) Species Distribution Models: prediction maps as tools for conservation. *Hydrobiologia* (SI Freshwater bivalves).

French naiad (Bivalvia: Margaritiferidae, Unionidae) species distribution models: prediction maps as tools for conservation

V. Prié · Q. Molina · B. Gamboa

Received: 31 December 2012 / Accepted: 8 June 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Freshwater mussels are amongst the most threatened invertebrate species worldwide. For some species, current distribution has contracted to a point whereby original extent and ecological requirements are difficult to assess. As a consequence, extirpation rate is poorly evaluated, surveys are not targeted towards suitable areas and species are not taken into account in development impact studies. In this paper, we developed species distribution models (SDM) and produced maps of suitable habitat for conservation purposes. We focused on *Margaritifera* and *Unio* species for which enough reliable data could be collated for whole continental France. For the first time at this scale, SDM were based on a river stretch

framework which proved to be very efficient. Models performances were highly discriminative, allowing drawing predictive maps of habitat suitability. As no human-induced variables were included, our models approximate species' ideal original range. Range contraction could then be quantified by comparing the extent of occurrence (EOO) predicted by the models to the currently known EOO of the species. For most species, known distribution matches the predicted suitable habitat suggesting that geographic barriers between main drainages do not impact naiads' distribution.

Keywords Range contraction · Inferred decline · River stretches · Continental insularity

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10750-013-1597-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Guest editors: Manuel P. M. Lopes-Lima, Ronaldo G. Sousa, Simone G. P. Varandas, Elsa M. B. Froufe & Amílcar A. T. Teixeira/Biology and Conservation of Freshwater Bivalves

V. Prié
Département Systématique et Évolution, USM 603/UMR 7138 "Systématique, Adaptation, Évolution", Équipe "Exploration de la Biodiversité", Muséum National d'Histoire Naturelle, C.P. 51, 55 Rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France

V. Prié (✉) · Q. Molina · B. Gamboa
Biotope – Recherche & Développement,
22 Bd Maréchal Foch, 34140 Mèze, France
e-mail: prié.vincent@gmail.com

Introduction

Freshwater mussels are amongst the most threaten species worldwide (Lydeard et al., 2004). Human impact on freshwater habitats and species is disproportionately greater than on terrestrial or marine ecosystems (Higgins & Duigan, 2009). Human impacts on biodiversity probably date back to the Pleistocene (Foreman, 2004; Donlan et al., 2006) but have become more significant for European freshwater ecosystems since the nineteenth century, with the industrial and agricultural revolutions. Principal threats are changes in water quality, such as altered sediment loads and nutrient inputs from agricultural nonpoint pollution, altered hydrological regimes

associated with impoundment operations, and, for some species, extirpation of host fish populations (Richter et al., 1997; Araujo & Ramos, 2000a; Bogan, 2008; Sabater & Tockner, 2010).

For some species, current distribution has contracted to a point whereby ecological requirements are difficult to assess. As an example, the critically endangered Giant Pearl Mussel *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) was previously known in all main rivers, from Denmark to Portugal. It is now restricted to six living populations worldwide (Prié et al., 2010). The classical literature gives vague information about its former distribution, but specific localities are rarely available, making it difficult to evaluate the ecological requirements and the extent of suitable habitat for this species.

Imprecise evaluation of suitable habitat has consequences in terms of conservation. Because invertebrates' population trend is rarely studied, range contraction is a main argument for the assessment of their conservation status. Range contraction has to be objectively quantified to justify their conservation status and their need of protection. Range contraction can be estimated only if original range is known, and original range can be estimated by mapping suitable habitat (IUCN, 2011). More pragmatically, there is a growing demand on species habitat maps for practical conservation purposes such as targeting survey areas or mapping vulnerability in the scheme of development impact studies.

Species' distribution models seem a promising way to explore the extent of what was there in the past and to compare it with what is left today. If major human-induced threats are withdrawn from the inputs, then models predictions should provide an approximation of the unspoiled baseline condition, from which bivalve species decline can be quantified.

Whether they study aquatic or terrestrial taxa, most models are based on grids (among others, see Arntzen, 2006; Wilson et al., 2010) and few of them use watersheds (Lassalle et al., 2009; Lassalle & Rochard, 2009). However, grids or watershed polygons include terrestrial habitats and ignore hydrological connections. Using river stretches (RS) appears more relevant for benthic freshwater taxa. In this paper, we developed GIS-based landscape habitat models for seven naiad species distribution in France, based on a large-scale RS database (Vogt et al., 2007). Five species distribution models (SDM) commonly used in

literature for freshwater taxa (Buisson et al., 2007; Buisson & Grenouillet, 2009; Elith & Leathwick, 2009; Grenouillet et al., 2010) were here applied to the RS framework as a combination of forecasts (Bates & Granger, 1969; Araújo & New, 2007). Models had high predictive values and range contraction could be inferred by comparing the models' suitable habitat predictions to the currently known species range (Wilson & Roberts, 2010).

Materials and methods

Systematic and considered taxa

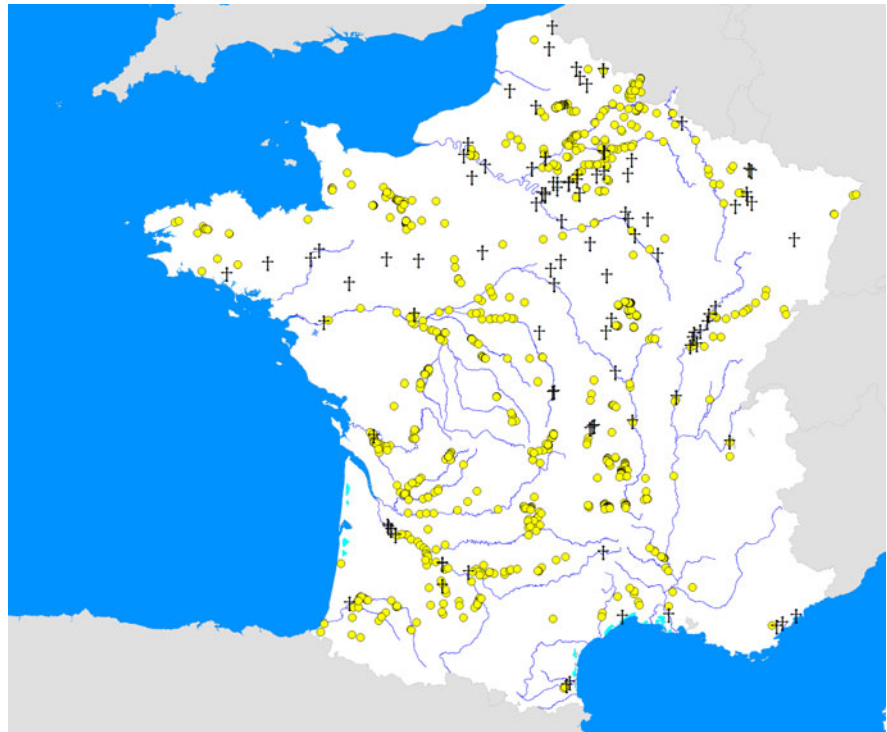
The study focuses on the so-called naiads, i.e. here two species of Margaritiferidae, *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus 1758) and *M. auricularia* (Spengler 1793) and five species of Unionidae: *Potomida littoralis* (Cuvier 1798), *Unio crassus* Philipsson 1788, *U. mancus* Lamarck 1819, *U. pictorum* (Linnaeus 1758) and *U. tumidus* Philipsson 1788. *Anodonta* species were not included because reliable data were too scarce. Introduced species were not considered either. For recently introduced species such as *Sinanodonta woodiana* (Lea 1834), expansion in France is still ongoing, and current distribution does not yet reflect ecological plasticity. For widespread species such as *Corbicula fluminea* (O.F. Müller, 1774), available data do not reflect actual distribution: *C. fluminea* is assumed to be common in almost all French rivers but is rarely mentioned in databases. Models have been designed at species level only because proper data for subspecies were too scarce to obtain robust statistics.

Databases and variables

Inputs

Recent and historical distribution data (Fig. 1) were collated from intensive sampling in France (for main sources, see Prié et al., 2010; Prié & Puillandre, 2013); reliable French naturalists' personal data (see acknowledgments for a list of participating persons); museum collections (mainly MNHN in Paris); and bibliographic data from the 1850s; although not all the historical data could be used due to taxonomic confusion and/or imprecise localities.

Fig. 1 Input presence data.
Dots recent data, crosses
historical data



RS are defined as the river portion between spring and the first tributary or between two tributaries. Input dataset included 3,480 presence data distributed into 768 RS. All the data have been placed in the Inventaire National du Patrimoine Naturel database (INPN Database, 2012). RS with presence data represent 4,455 km, accounting for 2.3% of the total French river network.

The absence can hardly be assessed. Available data may mention only one out of several species found in the same place; sampling protocols designed for large species may not be suitable for detecting smaller ones; and probability of observation is always smaller than one. As the models used here were based on the presence/absence data, we added 10,000 pseudo-absences randomly selected within the RS framework, based on MaxEnt package (Phillips et al., 2006) implemented into R (R Development Core Team, 2011; dismo package v 0.7–17; Hijmans et al., 2012).

Framework

Scales affect distribution (Poff, 1997). Most existing SDM are based on grids, watersheds or micro-habitats (Elith & Leathwick, 2009). From the naiads' perspective, grids are not accurate as they include terrestrial

habitat and do not describe flowing waters. By contrast, RS are ideally scaled to describe naiads' environment. Chemical variables for example are expected to be homogenous within a RS independently of its size, and more likely to be heterogeneous between RS, as water from a tributary mixes up with main stream.

The hydrographic network used here was the Pan-European River and Catchment Database (Vogt et al., 2007), restricted to continental France. This hydrographic network describes 83,284 RS from 0.1 to 38 km (90% being between 0.1 and 5 km). For each RS, the database provides information such as length (km) and catchment surface (km²).

Predictor variables

For the purpose of this study, only physical and climatic variables were considered as the expected result was an SDM independent from human impact. SDM can perform well if functionally relevant predictors are analyzed (Elith & Leathwick, 2009). Being aware of the importance of an extensive variable dataset, we were limited by the data availability, as our input database had to cover whole France and be suitable for GIS interpretation.

Geology (Geol) was chosen as a proxy for water pH, as most naiad species prefer limestone areas. The only available database that covers whole France is the European Soil Database (<http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/>). A single variable has been used in the models: siliceous or non-siliceous substrate. Each RS elevation (Alt, in metres) was extracted using Farr et al. (2007) topographic model. The stretches' slope (Slo, in ‰) was inferred from RS length and downstream and upstream altitudes. Erroneous data have been produced due to topographic model inaccuracy and have been manually corrected. Upstream cumulated length (UpCL, in metres) includes the length of all tributaries upstream a given RS and was considered relevant as it indicates the size and strength of the river. UpCL was given by Vogt et al. (2007). Distance to the sea (DSea, in metres) was considered relevant especially for Margaritiferidae species, which rely on diadromous and migratory host fish for their reproduction and dispersion. DSea was calculated from the middle of each RS. Water temperature could not be directly used as no data were available at this scale. However, water temperature is highly correlated to air temperature (Mohseni & Stefan, 1999; Caissie, 2006; Moatar & Gailhard, 2006), and air temperature is commonly used as proxy of water temperature (ex. Buisson et al., 2007; Buisson & Grenouillet, 2009; Lassalle et al., 2009; Lassalle & Rochard, 2009; Grenouillet et al., 2010). Recorded rainfall was considered relevant (i) for small rivers that may become temporarily dry in cases of low precipitations (e.g. in Mediterranean area), thus extirpating potential mussel populations, and (ii) because high recorded rainfall in mountain areas are correlated to high stream flows, that might negatively influence the freshwater mussels presence. Temperature and recorded rainfall data (quarterly min, max, annual mean and seasonality over the 1950–2000 periods) were obtained from Worldclim (Hijmans et al., 2005, downloaded in May 2012). Principal components analysis (PCA) ran on these variables showed for both temperature and precipitation that min, max and mean values were highly correlated and explained most of the first PCA axis, respectively, accounting for 73.78 and 75.32% of the total variation. Mean value for temperature (Temp, in °C) and rainfall (Rain, in millimetres) variables was used as a synthetic variable for these three values. Seasonality was correlated to the second axis, accounting for, respectively, 26.17 and 24.22% of the total variation; and was conserved as an independent

variable for temperature (Temp-S) and Rainfall (Rain-S).

Geographic predictors such as proximity, connectivity, etc. were deliberately ignored, assuming optimal dispersal capacity for naiads, i.e. transparency between RS as well as between watersheds, in order to test the hydrological network constraint on species distribution. Contemporary's extirpations causes such as water pollution, dams and impoundments, eutrophication, water extirpation, etc. are not taken into account by the models, which focus on an ideal naiads' unspoiled distribution.

Species distribution models

Models provide an estimation of favourable RS in regard to input dataset. This cannot be regarded as a proper 'prediction' but rather as 'suitability'. However, the term 'prediction' is generally used in the literature to facilitate global understanding.

We used five commonly used statistic models to infer potential distribution of French naiads: generalized linear models (GLM; McCullagh & Nelder, 1989), generalized additive models (GAM; Hastie & Tibshirani, 1990), random forest (RF; Breiman, 2001), factorial discriminant analysis (FDA) and aggregated boosted trees (ABT; De'ath, 2007). Seventy percent of the input data was randomly selected ten times, and was used as calibration dataset. Each SDM was then calibrated with these ten partial datasets, resulting in a total of 50 models. We used the remaining 30% of the input data as validation dataset to evaluate the model's performance. The strength of agreement among distribution data and each SDM was summarized with the true skill statistic (TSS, Allouche et al., 2006) following Liu et al. (2005), which synthesize the sensitivity (percentage of good presence predictions) and the specificity (percentage of good absence predictions); and by the 'area under the curve' (AUC) statistics (Hanley & Mcneil, 1982), determined from the so-called receiver-operated character plots (Fielding & Bell, 1997; Pearce & Ferrier, 2000).

For each of the 50 models, every suitability probability value of the validation dataset was used as a temporary threshold to calculate TSS. We chose for each model the value that maximizes TSS as final threshold value. This final threshold value was used to qualify a given RS as suitable or not for a given model. Global habitat suitability was then appreciated as a

number of models (from 0 to 50) predicting habitat suitability for a given RS. Predicted suitability was set to over 30 positive models, as this threshold includes about 95% of the input presence data (Table 1).

Range

Species range was estimated with the extent of occurrence (EOO) *sensu* IUCN (2011). EOO is defined as ‘the area contained within the shortest continuous imaginary boundary which can be drawn to encompass all the known, inferred or projected sites of present occurrence of a taxon’, i.e. a minimum convex polygon, excluding discontinuities in large area of unsuitable habitat, according to IUCN (2011). For *M. margaritifera*, such unsuitable areas are found and four polygons were considered (Brittany—Normandy, Massif Central, Pyrenees and Lorraine). EOO was calculated considering the predicted suitability, i.e. suitable habitat predicted by over 30 models. A few stretches significantly isolated from the main cohesive river networks were predicted to be suitable. These were not considered for measuring EOO, unless the presence data supported the occurrence of an isolated population there.

Results

Results are summarized in Figs. 2 and 3 and detailed in Online Resource 1 and 2.

Explanatory variables respective weights

One of the targets of this study was to explore the casual drivers of species distribution, models being both predictive and explanatory (Mac Nally, 2000).

Although non-siliceous substrate is obviously favoured by most species, geology was generally not considered by the models. We attribute the weak importance of this variable to the fact that rivers carry upstream sediment along and the local riverbed geology or water pH may not correspond to what is inferred from the polygons used in the GIS input database. *M. margaritifera* is an exception: as an upstream specialist, its localities are less likely to be influenced by upstream limestone rivers, explaining the Geol variable importance for its predictive distribution.

Slope and altitude were globally important explanatory variables (median value > 0.2) for all *Unio* species. Indeed, a lot of RS in mountain areas have steep slopes and subsequent fast-flowing waters unsuitable for mussel species to establish. Thicker shelled *Margaritifera* and *Potomida* species seem to be less influenced by these variables. UpCL gives an indication of river size. UpCL explanatory mean value is above 20% for all species. This could be attributable to the high number of small to very small RS, temporarily dried out or to numerous mountains’ small torrents that are unsuitable for mussels to establish. Not surprisingly, this variable is the most important for species living downstream in rather large rivers such as *M. auricularia* and *P. littoralis*. Climatic variables’ explanations were anecdotal for *M. auricularia*, which only seem to favour rather low rainfalls. Low explanation percentage of these variables may reflect its historically extended range, from Denmark to Portugal (Araujo & Ramos, 2000b), which largely overlaps France’s climatic variability and subsequent large ecological plasticity regarding climate variables. Temperature seasonality was one of the most important variables for *M. margaritifera*, which distinctly prefers low seasonality, but was

Table 1 Predictive performances of each model technique and average model for *P. littoralis* according to (i) evaluation dataset and (ii) the total input presence dataset

	FDA (%)	GLM (%)	ABT (%)	GAM (%)	RF (%)	Average model (%)
Evaluation dataset						
Presence	80	83	87	91	91	
Absence	87	93	92	91	93	
Input presence data	86	92	92	92	99	94

(i) Results of models evaluation processes based on 30% of the input data that are not included in the calibration dataset. (ii) Proportion of the input present dataset that falls within the suitability threshold (i.e. six out of ten models for each model technique, 30 out of 50 models for the average model)

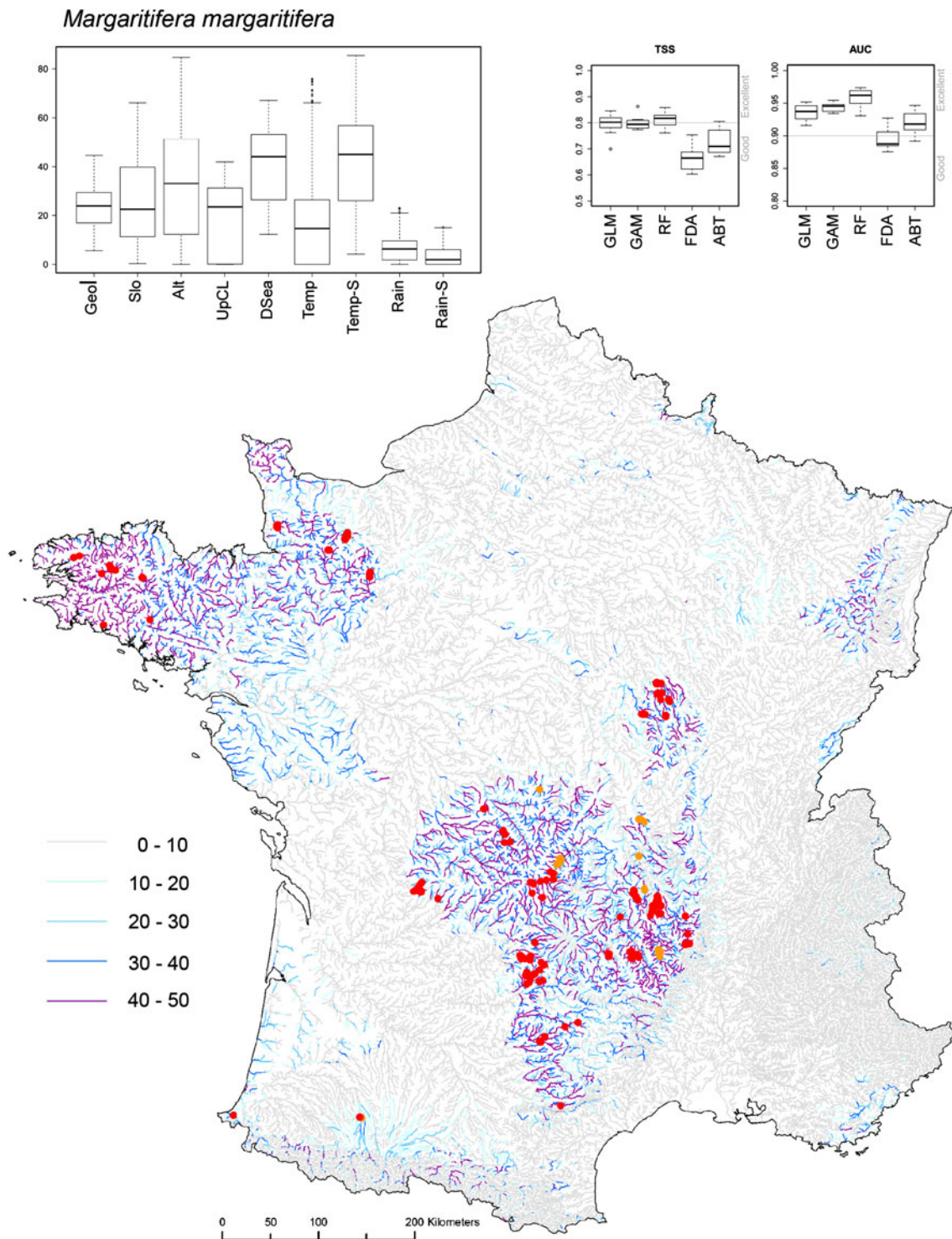


Fig. 2 SDM prediction map for *M. margaritifera*. Dark dots: living populations; light dots: populations known from shells only

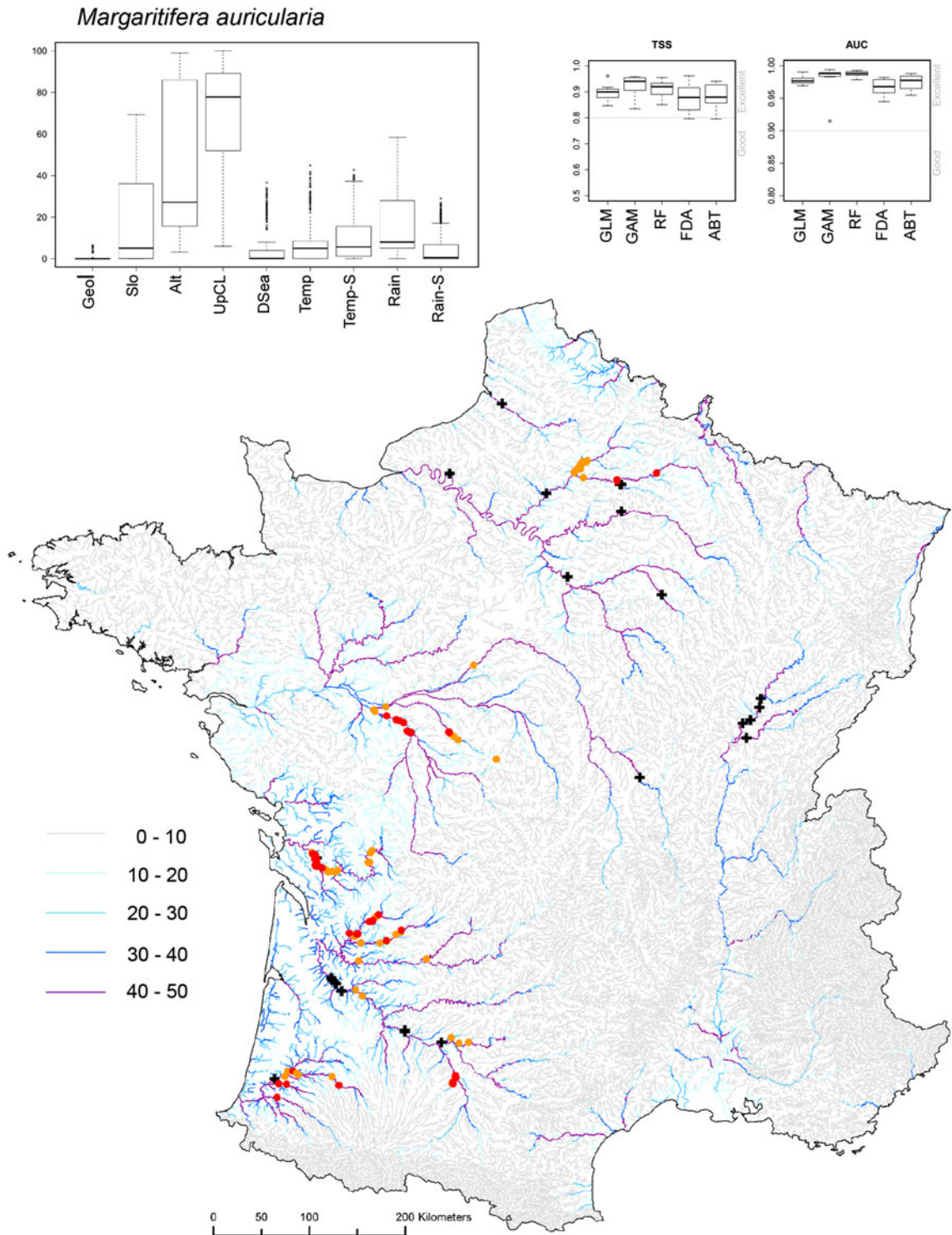


Fig. 3 SDM prediction map for *M. auricularia*. Dark dots living populations, *light dots* populations known from shells only, *crosses* historical data

anecdotic for all other species. Average temperature and, in a lesser extent, rainfalls had high explanatory values for *U. crassus*, *U. pictorum* and *U. tumidus*. France being the southernmost limit for these species, which distribution extends northeastward up to Russia (Fauna_Europaea, 2004, corrected for the Iberian Peninsula following Araujo et al., 2009), average temperature may be a limiting factor to their extension southward (see Online Resource 1).

Single SDM and average model performance

RS framework proved to be very efficient for naiads' SDM. Models performances were highly discriminative, with TSS > 70%; AUC > 90%; sensitivity and specificity > 80% for most models (see Online Resource 1). FDA, which is the simplest modelling method, had the lowest predictive values for most species. By contrast, RF, which corresponds to a combination of hundreds of trees, had generally one of the best predictive values. Suitability maps issued by the different model techniques were very divergent, as illustrated for *P. littoralis* in Online Resource 2. For this species, FDA and GLM predicted noticeably large suitable areas (respectively, 20 and 16% of the RS) in cohesive areas, while GAM and RF were more pessimistic (9% of the RS only). The combined model was eventually closer to the RF and GAM model techniques (Online Resource 2).

Range contraction

M. auricularia now occupies only 11% of its predicted EOO; *P. littoralis* and *U. tumidus* about a third; *U. crassus* and *M. margaritifera* about half of their predicted EOO. The most widespread species in this study, *U. pictorum* and *U. mancus*, currently occupy over 70% of their predicted EOO.

Discussion

Input database

Prevalence is considered to be amongst the most dangerous pitfall in SDM (Manel et al., 2001). However, according to (Allouche et al., 2006), if kappa statistics are indeed affected by prevalence, TSS provides a good alternative measure of accuracy and

is, just as AUC, independent on prevalence. This was a prerequisite as our dataset includes rare species and the presence data are obviously scarce.

In a context of global decline, historical data were highly valuable for the purpose of this study. SDMs might be biased if they are developed when a species is no longer found throughout its historical range. As peripheral populations become extirpated first, species having their distribution limits in France are expected not to be found in their historical range anymore. Moreover, species are most abundant at the centre of their environmental gradients range (Hochberg & Ives, 1999) which is known as the 'abundant centre' distribution model (Sagarin & Gaines, 2002). Detection probability is thus lower in peripheral areas than in the centre of the species distribution, and our input dataset is likely biased towards the centre of species distribution. Historical data, indeed often lying at the edge of predicted area of occurrence, were collated to counteract this bias.

Climate change could justify rejecting historical data for the prediction of species' suitable habitat. Mean world temperature has risen about 1°C since 1850 (Climatic Research Unit, University of East Anglia, <http://www.cru.uea.ac.uk/home>, consulted in 2013) and over 0.6°C in France. Increase in bird community temperature index since the 1990 correspond to a northward shift of about a hundred kilometres (Devictor et al., 2008). While the link between air and water temperature is well established, to what extent climate change has impacted water temperature in the recent past is controversial (see for example Moatar & Gailhard, 2006 vs Hammond & Pryce, 2007). We assume here that climate change has had a negligible impact on species range since 1850 compared to that of habitat degradation.

Models performances

Sensitivity performances (the presence predicting) were always higher than specificity (the absence predicting) due to the imbalanced absences/presences respective weights. TSS summarizes both values in a prevalence-independent measure of accuracy. Following (Thuiller et al., 2009), these performances were considered good to excellent for 98% of the models according to TSS and for all the models according to AUC. Predictive suitability maps accurately reflect the species' known past and present distribution, including

the literature's imprecise data which could not be included in the database (such as the Lorraine region drainages for *M. margaritifera* for which no precise data were included). Models are less accurate in predicting the absence than the presence, but the absence predictions of our models are ground truthed by our extensive sampling in France (Fig. 1).

Prediction: current and inferred distribution as tools for conservation

Providing the GIS-based potential presence data

With its 550,000 km², France is home to 187,800 km of rivers according to Vogt et al. (2007). If human impact can be observed in the large majority of them, only a few spots have been surveyed and most sites will probably never be. Models allow interpolation to unsampled sites (Elith & Leathwick, 2009), providing useful tools not only for biologists, as a gain of knowledge, but also for conservation, managers and environmental policies, particularly in the scheme of large-scale development and its corollary impact studies. In a context where a few vertebrate taxa concentrate most of public opinion's attention (Ponder & Lunney, 1999; Régnier et al., 2009), and despite their alarming decline (Lydeard et al., 2004), freshwater bivalves are rarely considered in impact studies in France, partly due to a lack of knowledge on both conservation issues and areas of occurrence. For the first time, our study provides to the conservationists and environment managers modelled maps of naiad species' potential occurrence in France. For any of the RS predicted as suitable, protected naiad species should be considered in the development impact studies.

Inferring decline from range contraction

Red lists criteria are rarely relevant for invertebrates. Population size in particular is hard to assess. But its trend can be inferred from the reduction of the area of occupancy (AOO) or EOO, providing initial distribution is known. Models are powerful tools to estimate historical AOO and EOO and to quantify decline for red lists assessments, as long as input data reflect historical distribution, and current distribution is accurately known.

Our input data are incomplete. Historical data are scarce and often too imprecise to be applied to GIS.

Models probably underestimate the true ecological plasticity and subsequent historical EOO of these species. On the other hand, we lack extensive surveys for most species to assess actual distribution. Together with probability of detection and abundance centre biases, current AOO is largely underestimated. It is, therefore, more reliable to use EOO, which quantifies range contraction only. However, only significant range contraction should be considered, and it should be ground truthed by adequate sampling.

Based on models predictions, *M. auricularia* and *P. littoralis*' EOO have undergone an important decline (Table 2), both species being considered extinct from the whole Seine catchment. *U. tumidus* is likely extirpated from the Loire catchment. This range contraction was expected as these three species have their distribution limit in France and outlier populations become extirpated first. For *M. auricularia* and, to a lesser extent, *P. littoralis*, this range contraction is material at a European scale.

Among the studied species, only *M. margaritifera* and *U. crassus* are listed in European Habitat Directive's annex II, a list of species for which Europe requires the designation of Special Areas of Conservation. *M. margaritifera* has a disjunctive distribution due to its ecological requirements and *U. crassus* is in France at the limit of its distribution range. Their current EOO is about half of what models predict. However, these species have an extended range that largely overtakes Europe (Graf & Cummings, 2007; Geist, 2010).

Our results highlight an imbalance between species enduring the most important range contractions and species considered by main conservation policies. Despite a range contraction of over 70% in France, *U. tumidus* and *P. littoralis* are neither included in the French list of protected species, nor in the European Habitats Directive. *M. margaritifera* and *U. crassus* benefit from both, although their range contraction appear to be less important in France. Albeit all these species are arguably threatened, the most imperiled ones should be considered when ranking conservation priorities.

Continental insularity versus suitability predictions

Naiads' dispersion largely relies on fish hosts (Bauer & Wächtler, 2001), most of them being freshwater

Table 2 Decline in area of occurrence inferred from the models' predictions of suitable habitat for two species of well-monitored naiads in France

	EOO (km ²)		Inferred range contraction (%)
	Current distribution	SDM prediction	
<i>M. auricularia</i>	50,030	469,000	89
<i>P. littoralis</i>	162,900	605,800	73
<i>U. tumidus</i>	83,800	285,500	71
<i>M. margaritifera</i>	99,540	211,380	53
<i>U. crassus</i> ^a	211,200	366,200	42
<i>U. mancus</i> ^b	395,800	573,500	31
<i>U. pictorum</i>	373,800	455,800	18

Models suitable habitat prediction is set to over 40 out of 50 models

^a Garonne and Charente drainages were excluded as no historical data support the occurrence of the species in these catchments

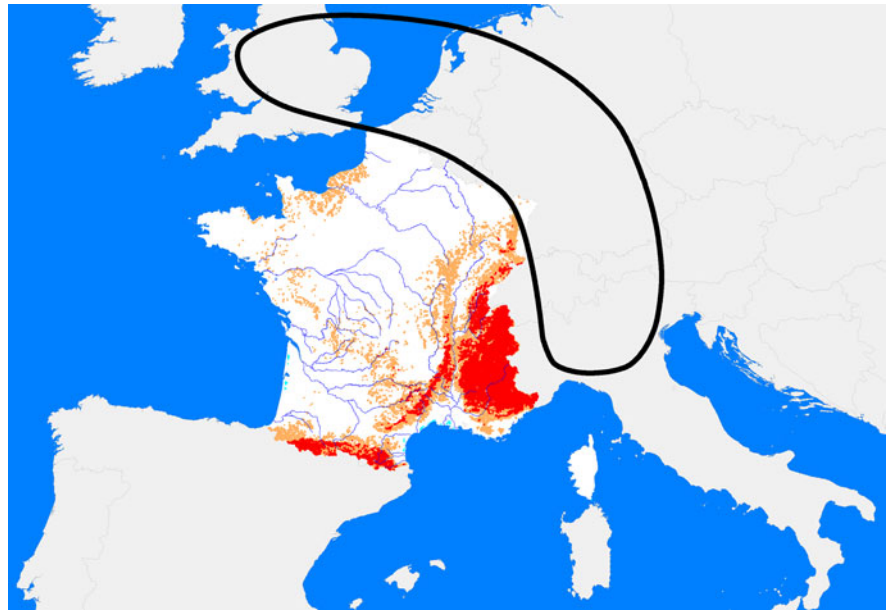
^b Rhine, Meuse and other small drainages north of the Seine's catchment were excluded as no historical data support the occurrence of the species in these catchments

exclusive (with the exception of salmonids and sturgeons for the Margaritiferidae). Coastal drainages should then theoretically be viewed as continental islands within which fish hosts provide efficient dispersion, but between which dispersion should remain anecdotal. Large-scale naiads' distribution should, therefore, be constrained by hydrological networks' connections or isolations and match coastal drainages, as observed for *U. mancus* subspecies (Prié et al., 2012). Seine and Loire Rivers have been connected in the recent past and rivers of the Manche coastal drainage have presumably been linked together during the Würm period. Danube, Rhine and Rhône basins have been connected during the Pliocene–Pleistocene period. Garonne River and other Atlantic coastal drainages south of the Loire River are believed to have remained isolated from the other major drainages mentioned above (Persat & Keith, 2011). Three major biogeographic units are thus expected in France, and species having their distribution limits in France are expected to be constrained by this hydrologic context. Conversely, our models deliberately ignore geographic proximity, connectivity or isolation between watersheds and their prediction are expected to go beyond geographic barriers. What better predicts naiads' distribution, environmental predictors or continental insularity?

The input data globally match the models predictions. Species appear to have fulfilled their predicted niche, suggesting that geographical barriers do not

hamper naiads from colonizing suitable habitat, a hypothesis also supported by molecular data (Prié & Puillandre, 2013). Exceptions to this are the Garonne and Charente drainages, where suitable habitat is predicted for species having their distribution limits in the Loire, Seine and upstream Rhône drainages (*U. crassus*, *U. tumidus* and, to a lesser extent, *U. pictorum*). *U. crassus* and *U. tumidus* have never been observed in these rivers, but *U. pictorum* has been collected casually in the Garonne and Adour drainages. We hypothesize that its occurrence outside of its cohesive watershed-based area of occurrence results from introduction, as no historical data support its occurrence in south-west France. *U. crassus* and *U. tumidus* being declining, they may not have benefit from these human-induced expansion opportunities. By contrast, *U. crassus*, *U. tumidus* and *U. pictorum* are found only in the upper Rhône drainage, within the area considered as suitable by the models, and historical data suggest that their presence in these drainages is not recent: *U. crassus* is mentioned from the Saône by Locard as early as 1889, under the name *U. euthymeanus*; *U. pictorum* by Bourguignat in Locard, 1882 under the name *U. gestroianus*; *U. tumidus* by Locard (1889) under the name *U. siliquiformis* (see Graf, 2011). These data all postdate the establishment of the Canal du Centre between the Saône and the Loire in 1791 and colonization may have occurred during the nineteenth century. A geographical barrier may have restricted *U. crassus*, *U. tumidus*

Fig. 4 SDM prediction map for the naiads' absence. *Dark* absence predictions for all the models, *light* presence predictions of less than 10 models over 50 for any species. The area surrounding east and north of France is a discontinuous corridor of urbanization in Western Europe, known as the 'blue banana', which is believed to act as a barrier for naiads' dispersion at a European scale



and *U. pictorum*'s expansion to the Rhône and southwest France drainages in ancient times, but nowadays, species have opportunity to colonize suitable habitat in adjacent drainages, and probably do so, unless they are declining.

To the scale of France, watersheds do not appear to constitute significant barriers for species dispersion, and their distribution seems to be structured by niche rather than watershed networks (Warfe et al., 2013). At a larger scale, models of the predicted absence for all the species (Fig. 4) show that France is isolated from the Iberian Peninsula by the Pyrenees; from Italy, Switzerland and southern Germany by the Alps and the Jura mountains; and remains connected to eastern Europe only in its northeastern limit. However, this region is part of the so-called 'blue banana' (Brunet, 2002) i.e. the most urbanized area in Europe, in which suitable habitats for naiad species are unlikely. French populations can thus be considered isolated from the rest of Europe which implies that the 'rescue effect' *sensu* IUCN (2003) does not influence their conservation, a pre-requisite for IUCN regional assessments.

Conclusion

The aim of the modelling was to produce maps of habitat suitability with no regard to geographic barriers or human perturbations. If our prediction

maps are used to approximate historical distribution, they provide a first step for inferring decline of species range and to propose, for example, objective data for assessing the IUCN category of a given species. For all the species having their distribution limits in France, models suggest a global range contraction, confirmed by the occurrence of historical data, supporting the assumption that outlier populations become extirpated first.

To the scale of France, geographic barriers do not seem to play an important role in naiads' distribution. Models are independent from geographic barriers and species distribution seems to be constrained rather by environmental predictors than by watersheds isolations. However, at a European scale, geographic barriers include sea, mountain areas of the Alps and Pyrenees, and the 'blue banana' urbanization area, which isolate France from the rest of Europe. Long-term conservation units of naiad species should, therefore, be designed at the European scale, rather than considering the coastal drainages as biogeographical units.

Acknowledgments Most of the data used for the models come from Biotope database and were compiled by Vincent Prié, Xavier Cucherat, Laurent Philippe, Benjamin Adam, Quentin Molina, Nicolas Legrand, Ludwick Simon, Charlie Pichon, Nicolas Patry, Noémie Tapko (Biotope) and includes specimens collected by Henri Persat (Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés), Michel Bramard,

Florent Lamand and Alain Serena (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques), Jean-Michel Bichain and Antoine Wagner. The following kindly provided us with reliable additional personal data: Gilbert Cochet, Olivier Hesnard, Benoit Lecaplain, Laurent Paris, Sylvain Vrignaud and Pierre-Yves Pasco. The authors also thank Nicolas Puillandre and Gargo Fontaine for constructive discussion during the redaction of this paper. Ian Killeen has edited the English. We also thank two anonymous reviewers for their constructive comments that allowed improving the overall quality of the manuscript. This study was produced with financial support of Biotope consultancy.

References

- Allouche, O., A. Tsoar & R. Kadmon, 2006. Assessing the accuracy of species distribution models: prevalence, kappa and the true skill statistic (TSS). *Journal of Applied Ecology* 43: 1223–1232.
- Araújo, M. B. & M. New, 2007. Ensemble forecasting of species distributions. *Trends in Ecology & Evolution* 22: 42–47.
- Araujo, R. & M. A. Ramos, 2000a. Status and conservation of the giant European freshwater pearl mussel (*Margaritifera auricularia*) (Spengler, 1793) (Bivalvia: Unionoidea). *Biological Conservation* 96: 233–239.
- Araujo, R. & M. A. Ramos, 2000b. A critical revision of the historical distribution of the endangered *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1782) (Mollusca: Margaritiferidae) based on Museum specimens. *Journal of Conchology* 37: 49–59.
- Araujo, R., J. Reis, A. Machordom, C. Toledo, M. J. Madeira, I. Gomez, J. C. Velasco, J. Morales, J. M. Barea, P. Ondina & I. Ayala, 2009. Las náyades de la península Ibérica. *Iberus* 27: 7–72.
- Arntzen, J., 2006. From descriptive to predictive distribution models: a working example with Iberian amphibians and reptiles. *Frontiers in Zoology* 3: 8.
- Bates, J. M. & C. Granger, 1969. The combination of forecast. *Operation Research Quarterly* 20: 451–463.
- Bauer, G. & K. Wächtler, 2001. *Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoidea*. Springer, Berlin.
- Bogan, A. E., 2008. Global diversity of freshwater mussels (Mollusc, Bivalvia) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 139–147.
- Breiman, L., 2001. Random forests. *Machine Learning* 45: 5–32.
- Brunet, R., 2002. Lignes de force de l'espace européen. *Mapemonde* 66: 14–19.
- Buisson, L. & G. Grenouillet, 2009. Contrasted impacts of climate change on stream fish assemblages along an environmental gradient. *Diversity and Distributions* 15: 613–626.
- Buisson, L., L. Blanc & G. Grenouillet, 2007. Modelling stream fish species distribution in a river network: the relative effects of temperature versus physical factors. *Ecology of Freshwater Fish* 17: 244–257.
- Caissie, D., 2006. The thermal regime of rivers: a review. *Freshwater Biology* 51: 1389–1406.
- De'ath, G., 2007. Boosted trees for ecological modeling and prediction. *Ecology* 88: 243–251.
- Devictor, V., R. Julliard, D. Couvet & F. Jiguet, 2008. Birds are tracking climate warming, but not fast enough. *Proceedings of the Royal Society of London—B Biological Sciences* 275: 2743–2748.
- Donlan, C. J., J. Berger, C. E. Bock, J. H. Bock, D. A. Burney, J. A. Estes, D. Foreman, P. S. Martin, G. W. Roemer, F. A. Smith, M. E. Soule & H. W. Greene, 2006. Pleistocene rewilding: an optimistic agenda for twenty-first century conservation. *The American Naturalist* 168: 660–681.
- Elith, J. & J. R. Leathwick, 2009. Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40: 677–697.
- Farr, T. G., P. A. Rosen, E. Caro, R. Crippen, R. Duren, S. Hensley, M. Kobrick, M. Paller, E. Rodriguez, L. Roth, D. Seal, S. Shaffer, J. Shimada, J. Umland, M. Werner, M. Oskin, D. Burbank & D. Alsdorf, 2007. The shuttle radar topography mission. *Reviews of Geophysics* 45: RG2004.
- Fauna Europaea, 2004. Fauna Europaea database. www.faunaeur.org/. Accessed July 2012.
- Fielding, A. H. & J. F. Bell, 1997. A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environmental Conservation* 24: 38–49.
- Foreman, D., 2004. *Rewilding North America*. Island Press, Washington, DC.
- Geist, J., 2010. Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of conservation genetics and ecology. *Hydrobiologia* 644: 69–88.
- Graf, D. L., 2011. Types of French freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia, Unionoidea) in the Arnould Locard collection at the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris. *Zoosystema* 33: 451–514.
- Graf, D. L. & K. Cummings, 2007. Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoidea). *Journal of Molluscan Studies* 73: 291–314.
- Grenouillet, G., L. Buisson, N. Casajus & S. Lek, 2010. Ensemble modelling of species distribution: the effects of geographical and environmental ranges. *Ecography* 34: 9–17.
- Hammond, D. & A. R. Pryce, 2007. *Climate Change Impacts and Water Temperature. Using Science to Create a Better Place*. Environment Agency, Bristol.
- Hanley, J. A. & B. J. Mcneil, 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143: 29–36.
- Hastie, T. & R. Tibshirani, 1990. *Generalised Additive Models*. Chapman and Hall, London.
- Higgins, J. V. & C. Duigan, 2009. So much to do, so little time: identifying properties for freshwater biodiversity conservation in the United States and Britain. In Boon, P. J. & C. M. Pringle (eds), *Assessing the Conservation Value of Freshwaters*. Cambridge University Press, New York: 61–90.
- Hijmans, R. J., S. E. Cameron, J. L. Parra, P. G. Jones & A. Jarvis, 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978.

- Hijmans, R. J., S. Phillips, J. Leathwick & J. Elith, 2012. *Dismo*—species distribution modeling. In R. Project (ed.).
- Hochberg, M. E. & A. R. Ives, 1999. Can natural enemies enforce geographical range limits? *Ecography* 22: 268–276.
- INPN Database, 2012. Muséum National d'Histoire Naturelle (ed). 2003–2012. *Inventaire national du Patrimoine naturel*. <http://inpn.mnhn.fr>.
- IUCN, 2003. *Guidelines for Application of IUCN Red List Criteria at Regional Levels*, Version 3.0. IUCN Species Survival Commission, IUCN, Gland.
- IUCN Standards and Petitions Subcommittee, 2011. *Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria*, Version 9.0. Prepared by the Standards and Petitions Subcommittee. Downloadable from <http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>.
- Lassalle, G. & E. Rochard, 2009. Impact of twenty-first century climate change on diadromous fish spread over Europe, North Africa and the Middle East. *Global Change Biology* 15: 1072–1089.
- Lassalle, G., M. Béguer, L. Beaulaton & E. Rochard, 2009. Learning from the past to predict the future: responses of European diadromous fish to climate change. *American Fisheries Society Symposium* 69: 175–193.
- Liu, C., P. M. Berry, T. P. Dawson & R. G. Pearson, 2005. Selecting thresholds of occurrence in the prediction of species distributions. *Ecography* 28: 385–393.
- Locard, A., 1882. *Catalogue général des mollusques vivants de France; mollusques terrestres, des eaux douces et des eaux saumâtres*. Prodrome de Malacologie Française, Paris.
- Locard, A., 1889. Contributions à la faune malacologique française: Catalogue des espèces françaises appartenant aux genres *Margaritana* et *Unio* connues jusqu'à ce jour. Paris.
- Lydeard, C., R. H. Cowie, W. F. Ponder, A. E. Bogan, P. Bouchet, S. A. Clark, K. S. Cummings, T. J. Frest, O. Gargominy, D. G. Herbert, R. Hershler, K. E. Perez, B. Roth, M. B. Seddon, E. E. Strong & F. G. Thompson, 2004. The global decline of nonmarine Mollusks. *BioScience* 54: 321–330.
- Mac Nally, R., 2000. Regression and model-building in conservation biology, biogeography and ecology: the distinction between-and reconciliation of-'predictive' and 'explanatory' models. *Biological Conservation* 9: 655–671.
- Manel, S., H. C. Williams & S. J. Ormerod, 2001. Evaluating presence-absence models in ecology: the need to account for prevalence. *Journal of Applied Ecology* 38: 921–931.
- Mccullagh, P. & J. A. Nelder, 1989. *Generalized Linear Models*. Chapman and Hall, London.
- Moatar, F. & J. Gailhard, 2006. Water temperature behaviour in the River Loire since 1976 and 1881. *Geoscience* 338: 319–328.
- Mohseni, O. & H. G. Stefan, 1999. Stream temperature/air temperature relationship: a physical interpretation. *Journal of Hydrology* 218: 124–141.
- Pearce, J. & S. Ferrier, 2000. Evaluating the predictive performance of habitat models developed using logistic regression. *Ecological Modelling* 133: 225–245.
- Persat, H. & P. Keith, 2011. Biogéographie et historique de la mise en place des peuplements ichtyologiques de France métropolitaine. In Keith, P., H. Persat, E. Feunteun & J. Allardy (eds), *Les poissons d'eau douce de France*, Biotope-Mèze and MNHN, Paris: 552.
- Phillips, S. J., R. P. Anderson & R. E. Schapire, 2006. Maximum entropy modelling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231–259.
- Poff, N. L., 1997. Landscape filters and species traits: towards mechanistic understanding and prediction in stream ecology. *Journal of North American Benthological Society* 16: 391–409.
- Ponder, W. F. & D. Lunney, 1999. The other 99%: the conservation and biodiversity of invertebrates. Royal Zoological Society of New South Wales, Mosman.
- Prié, V. & N. Puillandre, 2013. Molecular phylogeny, taxonomy and distribution of French naiads (Bivalvia, Unionidae). *Hydrobiologia*. SI Freshwater Bivalves. (submitted).
- Prié, V., P. Bousquet, E. Tabacchi, A. Séréna, B. Adam, P. Jourde, T. Deschamps, M. Charneau, T. Ticot, M. Bramard & G. Cochet, 2010. Nouvelles populations de Grande Mulette *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) (Bivalvia: Margaritiferidae) découvertes dans le sud-ouest de la France. *MalaCo* 6: 294–297.
- Prié, V., N. Puillandre & P. Bouchet, 2012. Bad taxonomy can kill: molecular reevaluation of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Unionidae) and its accepted subspecies. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 405: 18.
- R Development Core Team, 2011. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org/>.
- Régnier, C., B. Fontaine & P. Bouchet, 2009. Not knowing, not recording, not listing: numerous unnoticed mollusk extinctions. *Conservation Biology* 23(5): 1214–1221.
- Richter, B. D., D. P. Braun, M. A. Mendelson & L. L. Master, 1997. Threats to imperiled freshwater fauna. *Conservation Biology* 11: 1081–1093.
- Sabater, S. & K. Tockner, 2010. Effects of hydrologic alterations on the ecological quality of river ecosystems. In Sabater, S. & D. Barcelo (eds), *Water Scarcity in the Mediterranean: Perspectives Under Global Change*, Vol. 8. Springer, Berlin: 15–39.
- Sagarin, R. D. & S. D. Gaines, 2002. Geographical abundance distributions of coastal invertebrates: using one-dimensional ranges to test biogeographic hypotheses. *Journal of Biogeography* 29: 985–997.
- Thuiller, W., B. Lafourcade & M. Araujo, 2009. *Modelling Operating Manual for BIOMOD*. 90. In R Development Core Team (ed.).
- Vogt, J., P. Soille, A. De Jager, E. Rimaviciute, W. Mehl, S. Foisneau, K. Bodis, J. Dusart, M.-L. Paracchini, P. Hastrup & C. Bamps, 2007. A pan-European river and catchment database. In JRC Publications Repository (ed.).
- Warfe, D. M., N. E. Pettit, R. H. Magierowski, B. J. Pusey, P. M. Davies, M. M. Douglas & S. E. Bunn, 2013. Hydrological connectivity structures concordant plant and animal assemblages according to niche rather than dispersal processes. *Freshwater Biology* 58: 292–305.

Wilson, C. D. & D. Roberts, 2010. Modelling distributional trends to inform conservation strategies for an endangered species. *Diversity and Distributions* 17(1): 182–189.

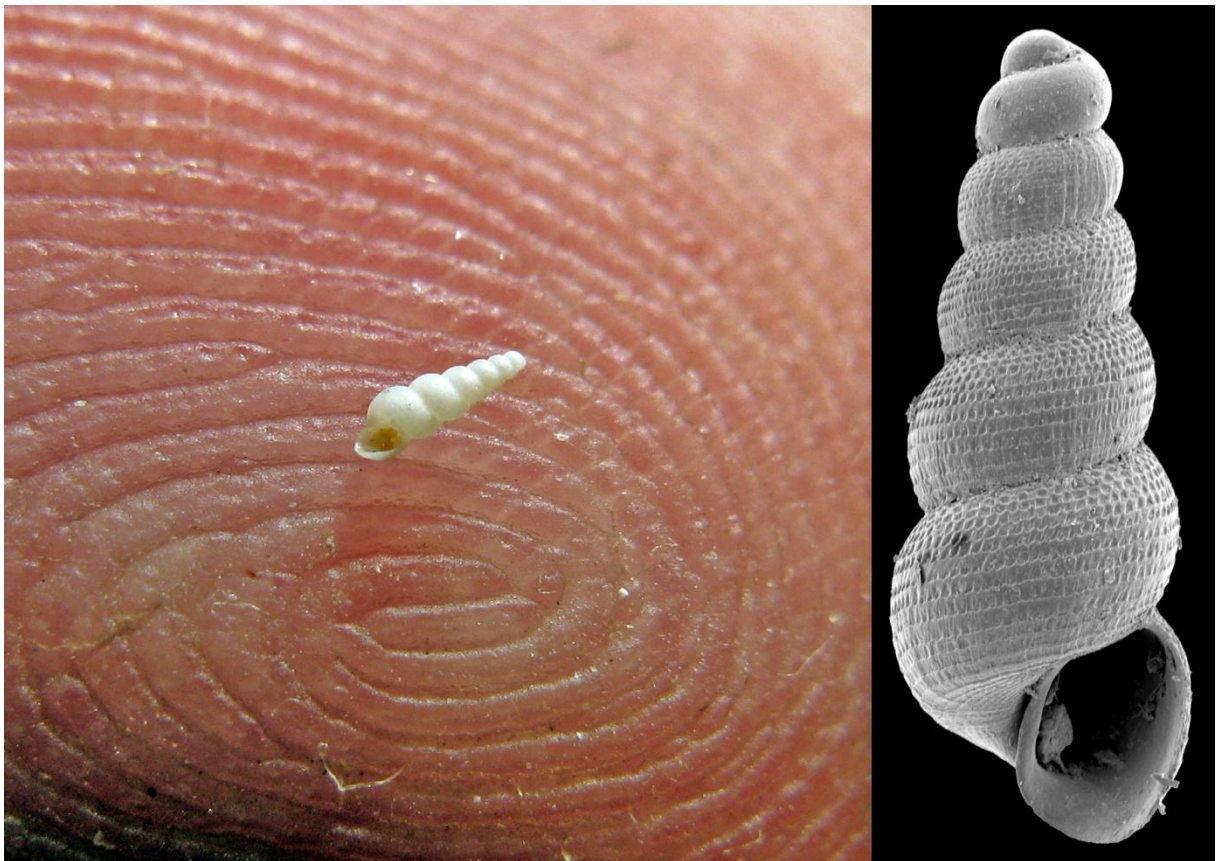
Wilson, C. D., D. Roberts & N. Reid, 2010. Applying species distribution modelling to identify areas of high conservation

value for endangered species: a case study using *Margaritifera margaritifera* (L.). *Biological Conservation* 144: 821–829.

RAPPEL DES PRINCIPAUX RESULTATS DE LA PARTIE II

- La morphologie des coquilles de naïades est très variable et ne permet pas toujours leur détermination au niveau spécifique ou sous-spécifique sur le terrain. J'ai donc utilisé une approche de type **barcode** pour déterminer les unités taxonomiques (ARTICLES 3-6).
- Les apports de la **génétique** permettent de montrer que la plupart des sous-espèces valides actuellement ne présentent pas de particularités génétiques justifiant leur maintien dans les listes de référence. Deux seuils de divergence (barcoding gaps) sont observés chez les naïades d'Europe ce qui pose la question du seuil de divergence à retenir pour le niveau spécifique (ARTICLE 6). Un marqueur indépendant, l'ADN mitochondrial mâle, pourrait confirmer les conclusions taxonomiques proposées ici (synonymisations) et peut-être appuyer le choix du barcoding gap à retenir pour le niveau spécifique.
- La distribution des unités taxonomiques retenues ne semble pas liée à l'organisation hydrologique, sauf dans le cas des sous-espèces d'*Unio mancus*. Au contraire, il semblerait d'après la modélisation d'habitats que la répartition des espèces suive les **contraintes environnementales** (ARTICLE 7)

Partie III : gastéropodes stygobies



Les gastéropodes stygobies figurent parmi les mollusques les moins connus. Ils sont difficiles à collecter, difficiles à déterminer, généralement micro-endémiques de systèmes karstiques locaux... pour tout dire, peu charismatiques. Bien qu'ils représentent plus du dixième des espèces de la malacofaune de France et qu'ils soient presque tous endémiques du territoire national, ils sont généralement ignorés des politiques de conservation.

J'ai collecté pendant une dizaine d'années des gastéropodes stygobies sur une zone d'étude restreinte constituée de différentes échelles hydrologiques (bassins-versants côtiers > bassins-versants de fleuves > massifs karstiques > hydrosystèmes > bassins-versants de sources). Face aux difficultés pour déterminer les espèces, je me suis d'abord limité aux genres et ai pu observer que leurs distributions étaient corrélées aux hydrosystèmes (chapitre III.1). A l'échelle des unités hydrogéologiques élémentaires, une morphométrie fine permet de distinguer les différentes populations au sein d'une même espèce putative (chapitre III.2). Ces différences révèlent-elles des unités évolutives ou des écotypes ? Dans le cadre d'une taxonomie intégrative, j'ai cherché à délimiter les unités évolutives présentes au sein des Moitessieriidae (famille composée de gastéropodes exclusivement stygobies), à partir des quelques dizaines de séquences que j'ai pu obtenir à l'issue d'un effort de prospection sans précédent.

Les résultats semblent indiquer que les unités taxonomiques actuellement valides sont génétiquement très structurées et que cette structuration suit celle des unités hydrologiques ; au point que plusieurs espèces nouvelles puissent être décrites (chapitre III.3). Au contraire des naïades, les variables environnementales ne semblent pas influencer la répartition des taxons de gastéropodes stygobies (chapitre III.4) et les unités de conservation peuvent être calquées sur les unités hydrogéologiques.

En termes de conservation, l'échelle de l'espèce semble peu pertinente puisque la plupart des hydrosystèmes karstiques hébergent une ou plusieurs espèces endémiques. Multiplier la liste des taxons dans les textes réglementaires, risquerait de rendre ces gastéropodes encore plus impopulaires. Il semble plus pragmatique de s'attacher à la préservation du milieu. Malheureusement, les exigences écologiques des écosystèmes souterrains sont en contradiction avec les mesures de gestion conservatoires actuellement en vogue pour la préservation d'espèces plus charismatiques.

III.1 LA " THEORIE DES BOUCHONS " : SCHEMA CONCEPTUEL DES ASSOCIATIONS FAUNISTIQUES

Le deuxième modèle utilisé pour tester la corrélation entre les hydrosystèmes et la répartition des espèces est diamétralement opposé : les gastéropodes stygobies sont de très petites espèces, largement méconnues, difficiles à échantillonner... Leurs capacités de dispersion sont en théorie limitées par la zone vadose (soit la zone sèche) du karst en amont et par la lumière en aval (au niveau des sources). La dispersion par zoochorie n'a pas été montrée pour ces espèces. On s'attend donc à ce que les masses d'eau souterraines isolées les unes des autres se comportent comme des îles, caractérisées chacune par une faune propre. Des crues exceptionnelles peuvent connecter épisodiquement des masses d'eau habituellement isolées et permettre la dispersion, le brassage génétique et l'homogénéisation des faunes. En revanche, les masses d'eaux qui ne sont jamais connectées entre elles devraient être chacune caractérisées par une faune propre (Fig. 33).

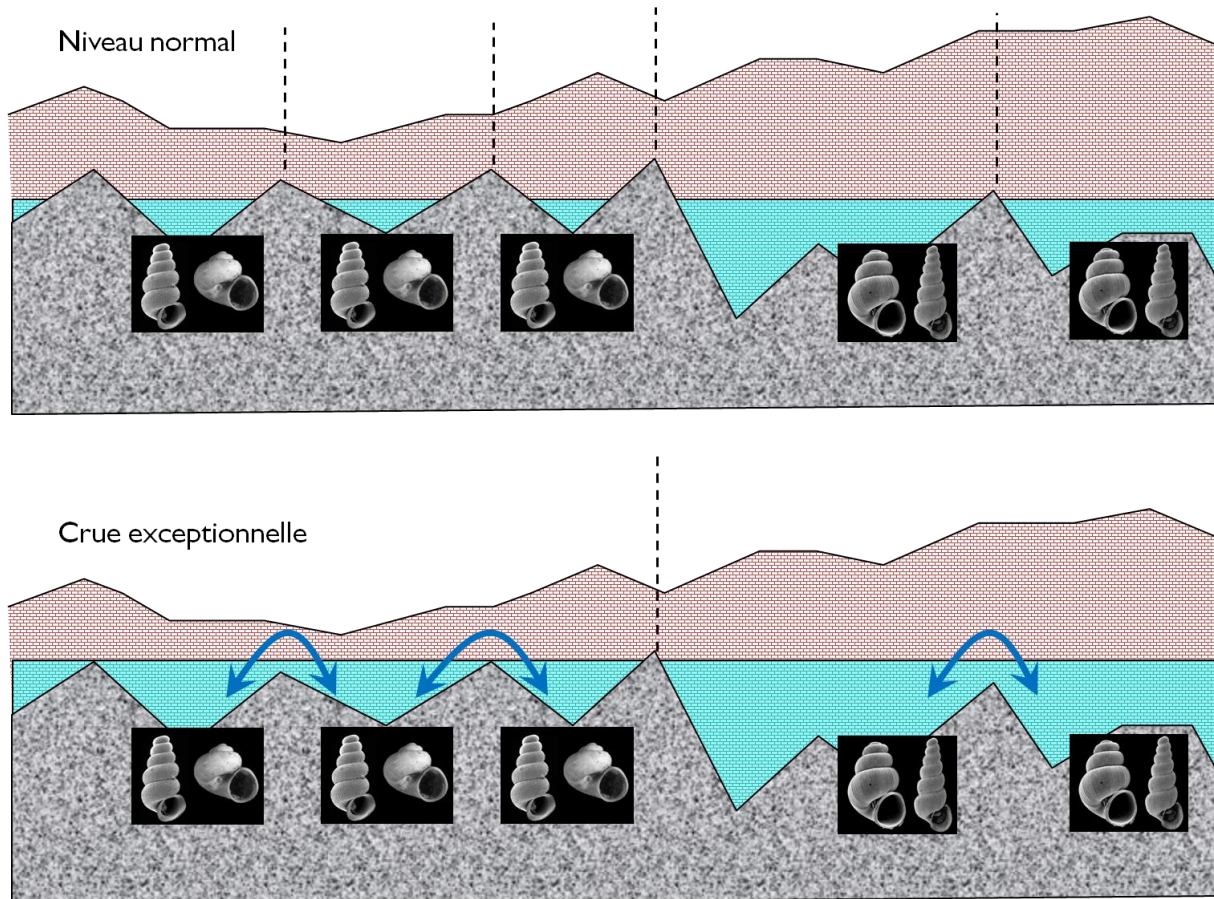


Figure 33 : le principe théorique de distribution des gastéropodes stygobies selon les masses d'eau. Différents aquifères karstiques peuvent être connectés épisodiquement par les crues exceptionnelles, qui permettent le brassage génétique et l'homogénéité des faunes, ou au contraire isolés en toutes circonstances, et dans ce cas caractérisés chacun par une faune propre.

Dans un travail précédent (Prié 2008), j'ai pu montrer par des échantillonnages itératifs, (i) que les associations faunistiques étaient identiques au sein d'un même hydrosystème échantillonné à différents endroits dans l'espace, et (ii) que les faunes récoltées étaient pérennes dans le temps. J'ai appelé cette hypothèse la théorie des bouchons : les coquilles vides se comportent comme des bouchons flottant à la surface des eaux, avec une dilution et une homogénéisation des coquilles des différentes espèces au sein d'une même masse d'eau ; et, potentiellement, une spécificité des associations de coquilles entre des masses d'eau isolées. Les associations faunistiques peuvent donc fournir une signature taxonomique des grands hydrosystèmes souterrains (Fig. 34, Tableau 9), et les coquilles des différents morphospecies peuvent être utilisées comme traceurs des hydrosystèmes.

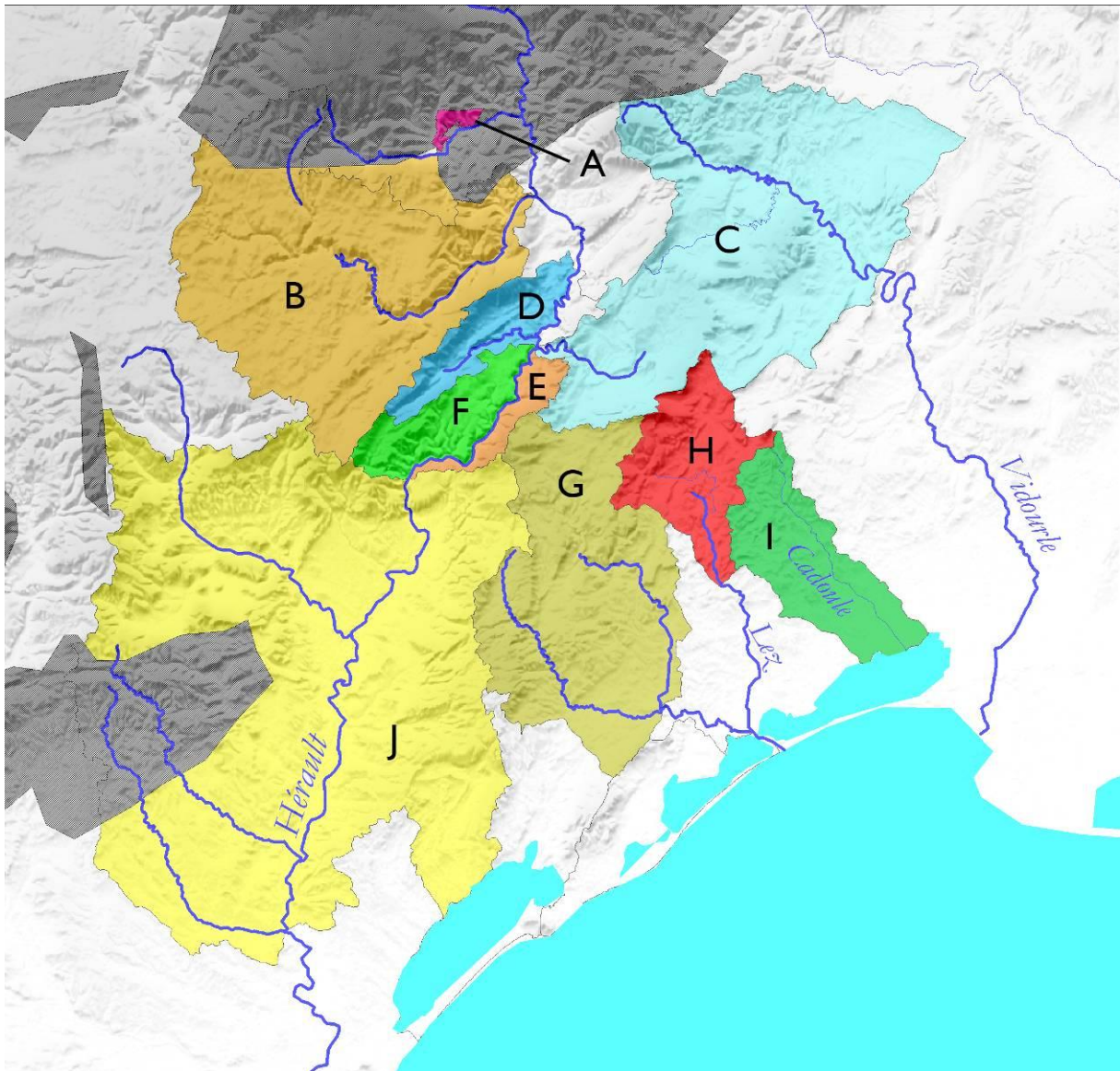


Figure 34 : signature taxonomique des grandes unités hydrogéologiques du Nord-Montpelliérain, observées ici par les associations faunistiques au niveau générique (la distinction entre *P. cf. pleurotoma* et *P. cf. conica*, qui présentent des formes bien différentes et se trouvent en sympatrie, a été ajoutée). En gris les zones siliceuses, imperméables et non karstiques. Les lettres attribuées aux grandes unités hydrogéologiques renvoient au Tableau 9.

Ce travail se basait sur l'examen de coquilles uniquement et, en raison de la difficulté de déterminer de manière fiable les différentes espèces sur des bases morphologiques, s'était par précaution limité le plus souvent au niveau générique. En effet, on ne trouve que très rarement deux espèces du même genre en sympatrie dans un hydrosystème donné. Les quelques exceptions telles que *Bythinella bouloti* et *B. galera* dans le réseau de Castelbouc Girardi *et al.* (2002) mériteraient d'être étudiées plus en détail : des récoltes effectuées après leur description (Prié & Bichain, ined.) laissent planer de sérieux doutes quant à leur distinction, faite sur des bases morphologiques uniquement. *Paladilbia pleurotoma* et *P. conica* se distinguent aisément sur la forme de la coquille et se trouvent en syntopie dans la source du Lez et les réseaux de Saint-Martin de Londres et Puéchabon, en rive gauche de l'Hérault. Une telle divergence de forme au sein d'un même genre est exceptionnelle chez mes hydrobioides.

La résolution de ces marqueurs biologiques des hydrosystèmes est donc grossière et soulève la question de la perméabilité des barrières hydrologiques : par exemple, le genre *Moitessieria* (représenté ici dans la plupart des cas par *Moitessieria cf. rolandiana*) est commun à la plupart des hydrosystèmes. Or ces hydrosystèmes se différencient entre eux par la présence ou l'absence d'autres genres dans le cortège faunistique. Si *Moitessieria cf. rolandiana* a pu coloniser tous ces hydrosystèmes adjacents, pourquoi d'autres

taxonx ne l'ont pas fait ? Les limites hydrogéologiques constituent-elles des barrières géographiques pour une partie seulement des taxons étudiés ? Ou est-ce que ces limites sont bien réelles et que le genre *Moitessieria* comporte plusieurs unités taxonomiques divergentes dans chacune des grandes unités hydrogéologiques ?

Tableau 9 : signature taxonomique des grandes unités hydrogéologiques du nord-montpelliérain. Les lettres en ordonnées du tableau renvoient aux unités illustrées par la figure 34.

	<i>Bythinella</i>	<i>Islamia</i>	<i>Moitessieria</i>	<i>Paladilhia cf. pleurotoma</i>	<i>Paladilhia cf. conica</i>	<i>Bythiospeum</i>	<i>Henrigirardia</i>
A	X						
B	X		X				
C		X	X	X		X	
D		X	X				
E				X	X		X
F	X	X	X				
G			X	X		X	
H	X	X	X	X	X	X	
I		X	X			X	
J			X				

De manière à tester l'étanchéité des limites des hydrosystèmes à une échelle plus fine, j'ai effectué un travail basé sur la morphométrie des coquilles. Combien de morphospecies peuvent être distingués au sein des genres établis ? La distribution géographique de ces morphospecies est-elle contrainte par les barrières hydrologiques ?

Par ailleurs, bien que les récoltes de mollusques souterrains vivants soient très rares, une approche génétique a pu être menée sur la plupart des genres de gastéropodes stygobies présents sur la zone d'étude.

III.2 VARIABILITE MORPHOLOGIQUE CHEZ *MOITESSIERIA* CF. *ROLANDIANA*

Le genre *Moitessieria* est largement répandu sur la zone d'étude et généralement collecté en abondance sous forme de coquilles dans les sédiments des sources et des réseaux souterrains. *Moitessieria rolandiana* était considéré comme la seule espèce présente sur l'ensemble de cette zone (Bertrand 2004). J'ai récolté depuis 2003 dans les réseaux de la Buèges et de la Séranne une forme remarquablement plus ventrue (Fig. 35A, B), qui présente des différences au niveau de l'apex et se sépare bien des formes typiques de *M. rolandiana* (Prié 2006). Je nomme ci-après cette forme "*Moitessieria* sp. 1". (Girardi 2009b) a décrit *M. magnanae* d'une exsurgence de Saint-Martin-de-Londres. Bien qu'il considère que cette forme soit une espèce distincte de *Moitessieria* sp. 1, il m'a semblé que d'autres caractères, idéalement moléculaires, étaient nécessaires pour définir si ces formes pouvaient être considérées comme des espèces distinctes. La limite orientale de l'aire de répartition de *M. rolandiana* est la vallée du Rhône. De l'autre côté se trouve *M. locardi* (et *M. rhodani*, considéré comme une espèce distincte par Girardi 2003), qui présente une forme similaire à *Moitessieria* sp. 1. L'analyse morphologique menée ci-dessous confirme (i) que *M. rhodani* et *Moitessieria* sp. 1 sont morphologiquement très proches ; (ii) que cette forme se distingue bien des formes typiques de *M. rolandiana* ; mais (iii) que les populations de *M. rolandiana* échantillonnées se distinguent également les unes des autres. La morphométrie étant le seul critère utilisé actuellement pour la description d'espèces de gastéropodes stygobies, les différences observées ici pourraient légitimement être considérées comme diagnostiques d'autant d'espèces nouvelles.

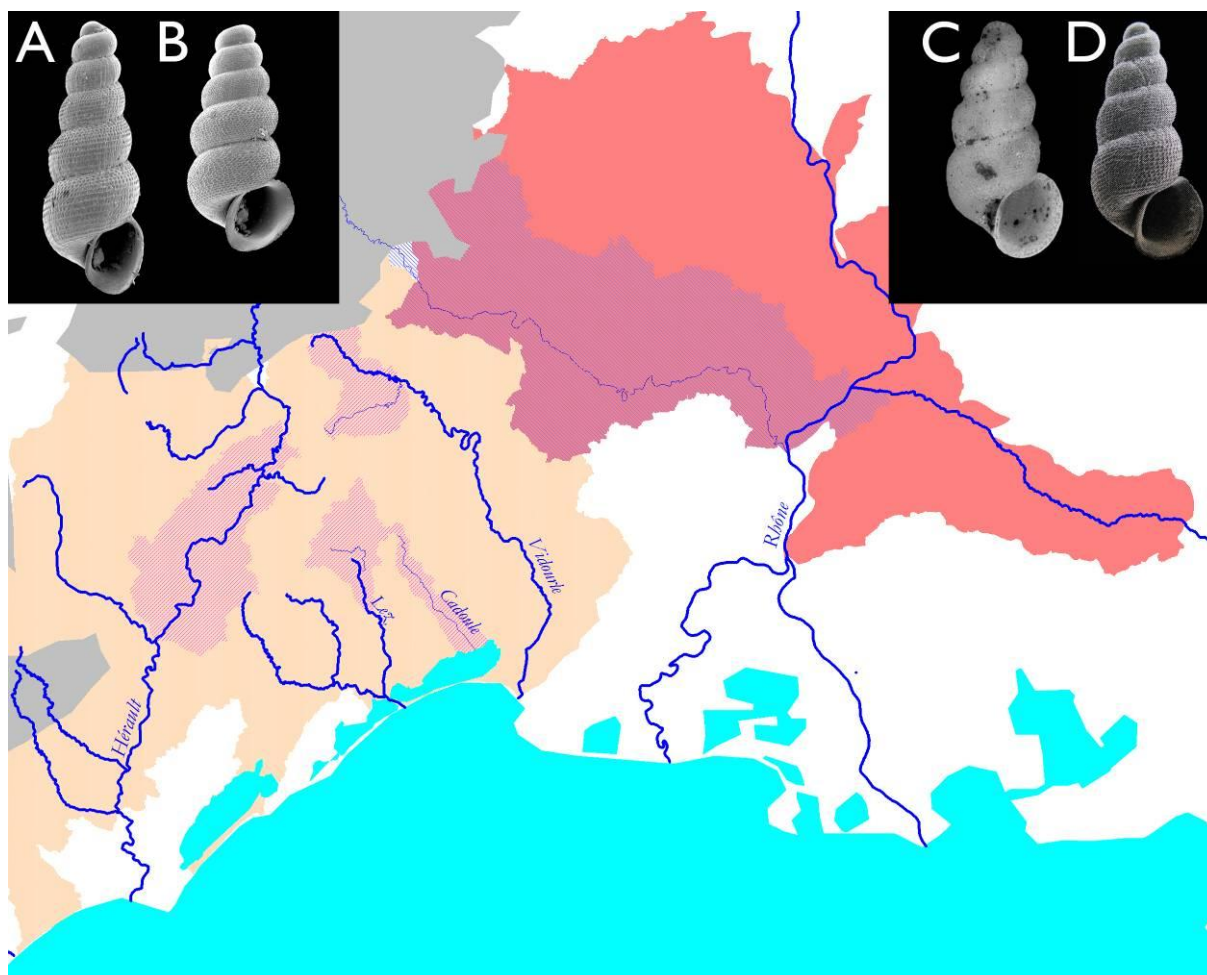


Figure 35 : le genre *Moitessieria* entre les bassins-versants du Rhône et de l'Hérault. A : *Moitessieria rolandiana* (aire de répartition en beige) ; B : *Moitessieria* sp. 1 (zones hydrographique où ce morphe a été trouvé figurées en rose à l'intérieur de l'aire de répartition du précédent) ; C : *M. locardi* (aire de répartition en rouge) ; D : *M. rhodani* (aire de répartition en mauve).

III.2.1 Matériel et méthodes

Quatre populations ont été échantillonnées : (1) Grotte de Rodel aval, (2) Aven du Rouet, (3) Foux de Pompignan et (4) sous-écoulement du Lirou (Fig. 36). Ces populations ont été choisies parce qu'elles correspondent à différents bassin-versants de fleuves côtiers méditerranéens : Hérault (1 & 2), Vidourle (3), Lez (4).

Des spécimens de *M. rhodani*, légués par Girardi, ont également été intégrés à l'analyse. Toutes ces populations appartiennent à des zones hydrogéologiques distinctes selon la base de données du SANDRE (2007). Les coquilles issues de ces populations ont été numérisées et mesurées selon la méthode décrite dans le § I.4.3.1.



Figure 36 : localisation des stations échantillonnées pour l'étude morphométrique de *M. cf. rolandiana*. (1) Grotte de Rodel aval, (2) Aven du Rouet, (3) Foux de Pompignan et (4) sous-écoulement du Lirou. Les lignes bleues représentent les principaux réseaux hydrographiques : Hérault à l'ouest, Lez au centre, Vidourle à l'est. Les lignes grises figurent les zones hydrographiques de la base de données du SANDRE (2007).

III.2.2 Résultats

Les valeurs de largeur (L, LdS et LdT) et de taille de l'ouverture (Ho et Lo) sont très corrélées ; les valeurs de hauteur (H) et de conicité (H/LdT et H/LdS) le sont également, dans une moindre mesure (Tableau 10). Les valeurs de largeur et de hauteur ont été respectivement retenues pour synthétiser ces valeurs corrélées.

Tableau 10 : matrice des corrélations entre les mesures prises sur les coquilles

	H	L	LdS	LdT	Ho	Lo	H/L	H/LdT	LdT-LdS	Ho/Lo
H										
L	0,44									
LdS	0,53	0,85								
LdT	0,51	0,93	0,91							
Ho	0,58	0,87	0,77	0,82						
Lo	0,36	0,91	0,80	0,83	0,88					
H/L	0,71	-0,33	-0,11	-0,20	-0,08	-0,34				
H/LdT	0,76	-0,20	-0,08	-0,17	0,04	-0,21	0,96			
LdT-LdS	0,20	0,61	0,29	0,65	0,51	0,46	-0,27	-0,25		
Ho/Lo	0,38	-0,19	-0,17	-0,12	0,12	-0,37	0,54	0,52	0,03	

Les axes 1 et 2 de l'ACP expriment respectivement 62,2 et 26,7 % de la variance (Fig. 37).

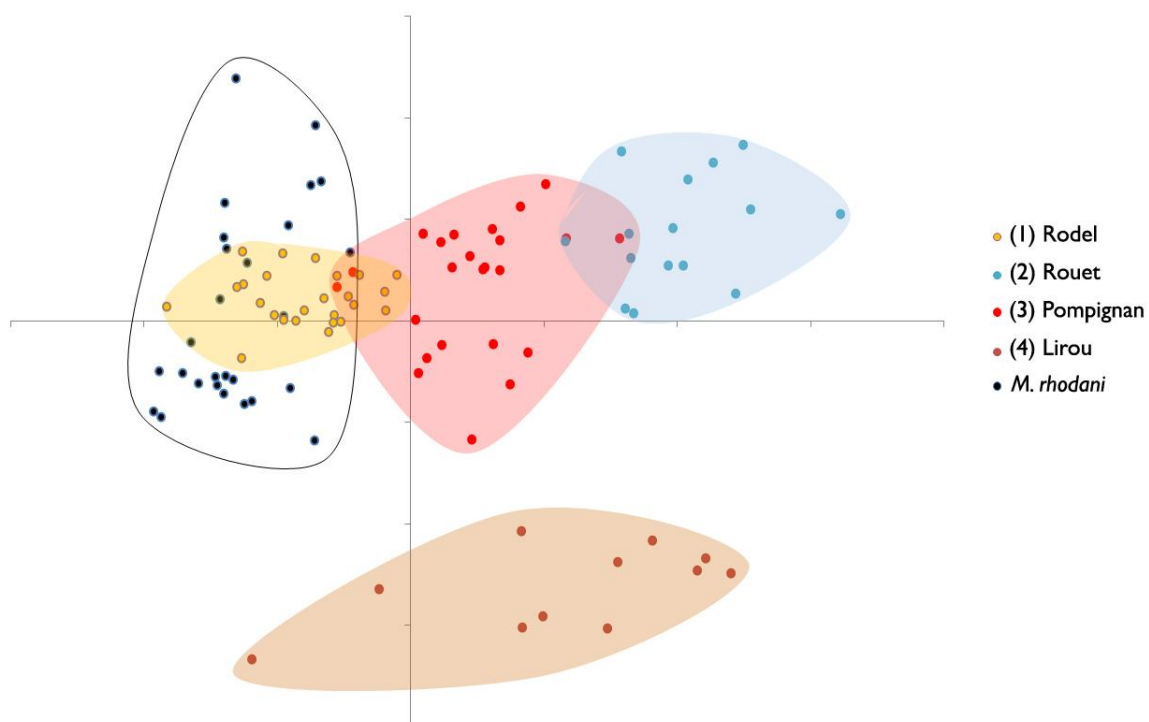


Figure 37 : projection des individus sur les axes 1 et 2 de l'ACP.

III.2.3 Discussion

Pour des questions de lisibilité, les résultats présentés ici se limitent à quatre populations distantes de quelques dizaines de kilomètres. La même méthode a été appliquée à d'autres populations (Prié 2006 ; Bousquet 2010) et les résultats sont similaires : chaque population se différencie morphologiquement, avec parfois des recouvrements, mais qui ne sont pas liés à la proximité géographique. La seule tendance observée est la variation de la hauteur des coquilles, qui suit un gradient nord-sud, ce qui pourrait s'expliquer par la loi de Bergmann : la température moyenne des eaux décline avec l'augmentation de la latitude, favorisant les grands individus au nord (Prié 2006).

Au cours des 30 dernières années, beaucoup de nouvelles espèces de gastéropodes stygobies ont été décrites. Ces descriptions ne sont pas liées aux progrès de la science, par exemple à l'utilisation de méthodes modernes telles que la génétique, qui pourraient produire un changement de paradigme, non : elles s'appuient toujours principalement sur l'opinion de l'auteur sur la forme de la coquille (ex. *M. calloti*, Girardi, 2003 ; *Paladillia jamblussensis* Bertrand, 2003), parfois étayée d'analyses morphométriques succinctes (opposition des mesures brutes de hauteur et de largeur, ex. *M. fontsainteii*, Bertrand, 2009 ; *Spiralix thaisensis*, Girardi, 2009) et se rapprochent généralement, dans leur forme, des descriptions du XIX^e siècle. La méthode présentée ici pour la morphométrie des coquilles n'a été utilisée que pour deux descriptions d'espèces : *Bythinella navacellensis* (Prié & Bichain 2009) ; et *B. bouloti* et *B. galerae* (Girardi *et al.* 2002). Les quatre populations de *Moitessieria* cf. *rolandiana* étudiées ici pourraient donc, en suivant les méthodes en cours actuellement, être décrites comme autant d'espèces distinctes.

Moitessieria sp. 1 (population 1 de l'Aven de Rodel aval sur la Fig. 37) est morphologiquement proche de *M. rhodani*. Il est en revanche biogéographiquement assez distant, puisque ce dernier est propre au bassin-versant du Rhône.

La projection de ces résultats à l'ensemble des karsts de France donne une image vertigineuse de l'inflation taxonomique qui résulterait d'une approche basée uniquement sur la morphométrie : ici, l' α -diversité est multipliée par quatre en ne considérant qu'un seul taxon, sur une aire d'étude d'à peine 200 km², alors que l'aire de répartition totale de *M. rolandiana* est estimée à 20 000 km² (Cuttelod *et al.* 2011).

L' α -diversité des gastéropodes stygobies est-elle sous-estimée ? Ou est-ce que les morphospecies observés ne correspondent pas à des lignées évolutives distinctes (phylotypes) mais plutôt à des adaptations morphologiques liées aux caractéristiques environnementales (écotypes) ?

L'étude du patrimoine génétique peut permettre de corroborer l'une ou l'autre de ces hypothèses.

III.3 STUCTURATION GÉNÉTIQUE : DARK SIDE OF THE EARTH

L'étude de la diversité génétique des gastéropodes stygobies se heurte à deux obstacles majeurs : d'une part les récoltes d'animaux vivants sont très rares, d'autre part l'amplification des gènes choisis est très difficile. En conséquence, je dispose de très peu de données pour étudier cette structuration.

Toutefois, des analyses ont pu être menées sur les genres *Paladilbia*, *Moitessieria*, *Bythiospeum* pour les Moitessieriidae et *Islamia*, *Heraultiella*, *Fissuria* pour les Hydrobiidae. Elles tendent à montrer une forte structuration génétique, corrélée aux bassins-versants. Les apports de la morphométrie permettent, dans une optique de taxonomie intégrative, de distinguer des unités évolutives qui peuvent être élevées au rang d'espèce.

ARTICLE 8

Prié, V., Bouchet, P., Puillandre, N. *in prep.* Dark side of the earth: cryptic species in cryptic places challenge alpha-diversity assessments

Dark side of the earth: cryptic species in cryptic places challenge alpha-diversity assessments

Vincent Prié

Philippe Bouchet

Nicolas Puillandre

To be submitted to *Frontiers in Zoology*

Introduction

The subterranean world remains a *terra incognita* for the biologist, mainly because of the difficulty to sample. This is even more problematic for stygobite species, for which sampling inside the subterranean aquatic network requires highly qualified scuba diver skills. Consequently, most of the sampling effort is focused on springs, especially for mollusks, whose shells are quite easily collected in the springs' sand and sediment. However, springs provide only a narrow window to the subterranean realm. Live specimens are rarely collected that way and half of the French species described so far have never been collected alive [1]. Only two specimens of the strictly stygobite Moitessieriidae family, one *Bythiospeum* sp. and one *Moitessieria* cf. *puteana*, have been successfully sequenced and included in a molecular phylogeny [2].

Nevertheless, stygobite mollusks are still being described at an increasing rate. Ninety-six strictly subterranean mollusc taxa are now described from France alone [3, 4], mostly located in the karstic Mediterranean drainages, known to be a hotspot for stygobite fauna [5-7]. They are distributed in three families: Amnicolidae Tryon, 1863, Hydrobiidae Stimpson, 1865 and Moitessieriidae Bourguignat, 1863. The Moitessieriidae family is the only strictly stygobite mollusc family, consisting in 71 species and subspecies in France [3], distributed in nine genera: *Moitessieria* Bourguignat, 1863; *Paladilbia* Bourguignat, 1865; *Bythiospeum* Bourguignat, 1882; *Spiralix* Boeters, 1972; *Palaospeum* Boeters, 1999; *Henrigirardia* Boeters & Falkner, 2003; *Meyrargueria* Girardi, 2009; *Corseria* Boeters & Falkner, 2009; *Sorbolia* Boeters & Falkner 2009. About two thirds of the genera and two-thirds of the terminal taxa were described in the late 40 years, mostly by amateurs using the methods and criteria that prevailed in the 19th century: subjective appreciation of shell shape and basic biometry, with no use of modern tools such as genetic or appropriate morphometry. These description efforts can be congratulated [8], but the resulting taxonomic inflation remains questionable as the scarcity of the material collected prevents any appropriate discussion on reproductive isolation, morphological and genetic divergences and biogeographic issues.

In this paper, we present the results of ten years of collecting effort in a restricted karstic area in southern France, involving scuba diving in caves, which allowed collecting live material suitable for both molecular and morphometric analyses. This material was used in an integrative taxonomy approach based on the COI, 16S and 28S genes, along with morphological and hydrogeological data, to propose species hypotheses. We hypothesized that stygobite molluscs' populations could be isolated from one another upstream by the unsaturated zone of the karst (the vadose zone) upstream and downstream by light and competition with the epigeal fauna. Therefore, karstic hydrosystems could be viewed as subterranean continental islands between which the faunas have progressively diverged, leading to important radiations. The results suggest that subterranean biodiversity is structured by the hydrological networks, and that species diversity of stygobite molluscs is underestimated.

Material and methods

Taxon sampling

This study focuses on the Moitessieriidae from southern France (Fig. 1, stations 2-12) located from west to east in the Hérault, Lez, Cadoule Vidourle and Rhône drainages. One locality lying within the Garonne drainage was added (Gloriette spring, Fig. 1 station 1).

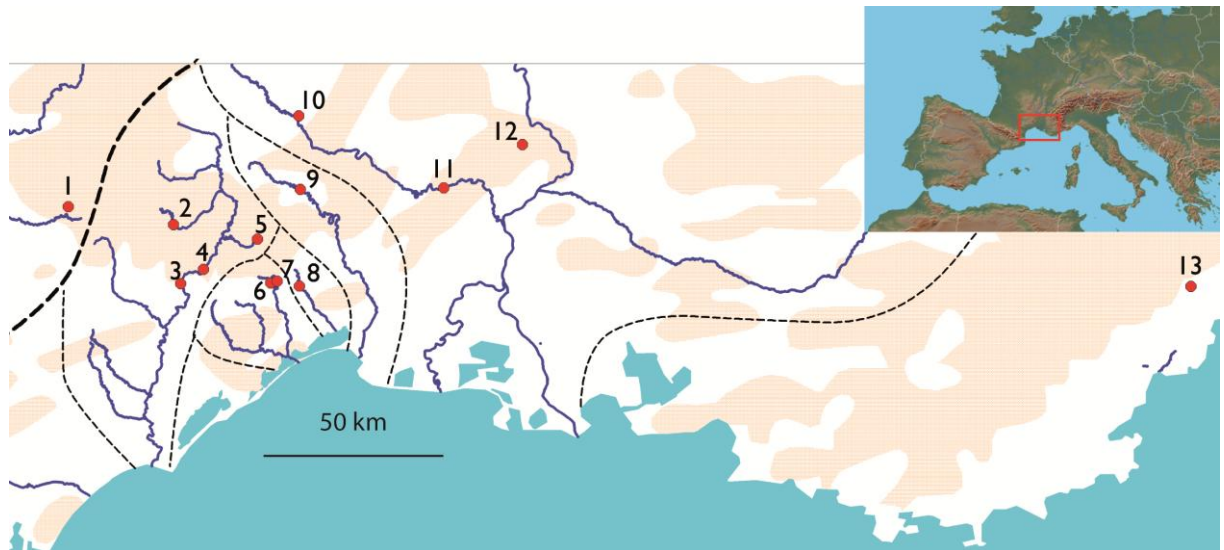


Fig. 1: sampling sites. Site numbers refer to Table 1. Blue lines: main rivers; black dotted lines: coastal drainages limit, from west to east: Garonne River (Atlantic coastal drainage), Hérault, Lez, Cadoule, Vidourle and Rhône Rivers (Mediterranean coastal drainage); pink areas: karstic formations.

Sampling was performed in caves, springs and into the riverbed rocks (hyporheic zone). For each of these biotopes, we used several collecting methods: 1) in caves, living animals were collected on the spot by sight and various amounts of sediment were collected; 2) in springs, sediment was collected and drifting fauna was sampled using drifting nets during flood events; and 3) the hyporheic zone was investigated with the Bou-Rouch pumping method [9]. Cave and spring sediments were first soaked in tap water and left in the dark for a few days in order to leave enough time for live animals to reach the surface of the sediment.

After collecting the live specimens, the sediment was dried and poured into water again, thus allowing empty shells to surface. Live specimens were killed by an immersion in boiling water for few seconds, in order to avoid an impermeable close of the operculum [10], and then fixed in 95% ethanol.

Table 1: List of specimens with location, GenBank accession numbers (GnBk = GenBank numbers coming soon), and attribution to Primary Species Hypotheses (PSH) following Automatic Barcode Gap Definition (ABGD)

Genus (based on morphology)	Location	Species name (when mined from GenBank) or locality	Specimen number	GenBank accession number			COI				16S				28S	Final species hypotheses	Species name
				COI	16S	28S	Partition 1	Partition 2	Partition 3	Partition 4	Partition 1	Partition 2	Partition 3	Partition 4	Partition		
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Wickede im Ruhrtal	<i>busmanni</i>		HM107134			1	1a	1a	1a						1	<i>B. busmanni</i>
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Heubach, Teufelsklingen Broeller	<i>acutum</i>		HM107121			1	1b	1b	1b						2	<i>B. acutum</i>
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Heubach, Teufelsklingen Broeller	<i>acutum</i>		HM107120			1	1b	1b	1b							
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Heubach, Teufelsklingen Broeller	<i>acutum</i>		HM107119			1	1b	1b	1b							
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Braunsbach, Wasserfraale	sp.		HM107127			1	1b	1b	1b							
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Braunsbach, Wasserfraale	sp.		HM107126			1	1b	1b	1b							
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Muehlheim an der Donau, Wulfbachquellhoehle	<i>saxigenum</i>		HM107125			1	1b	1b	1b							
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Horb am Neckar, Diessen, Haugensteinmuehle	<i>suevicum</i>		HM107118			1	1b	1b	1b							
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Horb am Neckar, Diessen, Haugensteinmuehle	<i>suevicum</i>		HM107117			1	1b	1b	1b							
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Horb am Neckar, Diessen, Haugensteinmuehle	<i>suevicum</i>		HM107116			1	1b	1b	1b							
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Garbenstetten, Falkensteiner Hoehle	<i>quenstedti</i>		HM107115			1	1b	1b	1b							
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Garbenstetten, Falkensteiner Hoehle	<i>quenstedti</i>		HM107114			1	1b	1b	1b							
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Garbenstetten, Falkensteiner Hoehle	<i>quenstedti</i>		HM107113			1	1b	1b	1b							
<i>Bythiospeum</i>	Switzerland: Soubey, Source de Cote au Bouvier	<i>francomontanum</i>		HM107131			1	1c	1c	1ca					3		
<i>Bythiospeum</i>	Switzerland: Soubey, Source de Cote au Bouvier	<i>francomontanum</i>		HM107130			1	1c	1c	1ca							
<i>Bythiospeum</i>	Switzerland: Cormoret, Source de la Raisette	<i>francomontanum</i>		HM107133			1	1c	1c	1cb							
<i>Bythiospeum</i>	Switzerland: Cormoret, Source de la Raisette	<i>francomontanum</i>		HM107132			1	1c	1c	1cb							
<i>Bythiospeum</i>	Switzerland: Neuchatel, Source de la Serriere	<i>francomontanum</i>		HM107129			1	1c	1c	1cb							
<i>Bythiospeum</i>	Switzerland: Neuchatel, Source de la Serriere	<i>francomontanum</i>		HM107128			1	1c	1c	1cb					4	<i>B. francomontanum</i>	
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Wendlingen am Neckar, Schaeferhausen	<i>pellucidum</i>		HM107124			1	1c	1c	1cb							
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Wendlingen am Neckar, Schaeferhausen	<i>pellucidum</i>		HM107123			1	1c	1c	1cb							
<i>Bythiospeum</i>	Germany: Wendlingen am Neckar, Schaeferhausen	<i>pellucidum</i>		HM107122			1	1c	1c	1cb							
<i>Bythiospeum</i>	France : Cadoule	8	B37	coming soon			1	1c	1c	1cc					5	<i>B. bourguignati</i>	
<i>Bythiospeum</i>	France : Cadoule	8	B34	coming soon		coming soon	1	1c	1c	1cd				1			
<i>Bythiospeum</i>	France : Crès	5	B158		coming soon						1	1a	1a	1aa			
<i>Bythiospeum</i>	France : Crès	5	B160		coming soon						1	1a	1a	1aa			
<i>Bythiospeum</i>	France : Crès	5	B162	coming soon			1	1c	1c	1ce							
<i>Bythiospeum</i>	France : Crès	5	B165	coming soon			1	1c	1c	1ce							
<i>Bythiospeum</i>	France : Sauve	9	B2042	coming soon	coming soon	coming soon	1	1c	1c	1cf	1	1a	1a	1aa	1		
<i>Bythiospeum</i>	France : Sauve	9	B2044	coming soon	coming soon	coming soon	1	1c	1c	1cf	1	1a	1a	1aa	1		
<i>Bythiospeum</i>	France : Sauve	9	B2043	coming soon	coming soon	coming soon	1	1c	1c	1cf	1	1a	1a	1ab	1		

<i>Bythiospeum</i>	France : Nizon	12	B190		coming soon					1	1b	1b	1b			
<i>Bythiospeum</i>	France : Nizon	12	B191		coming soon					1	1b	1b	1b			
<i>Bythiospeum</i>	France : Nizon	12	B192	coming soon		coming soon				1	1c	1c	1cg		1	8
<i>Bythiospeum</i>	France : Nizon	12	B193	coming soon		coming soon				1	1c	1c	1cg		1	
<i>Bythiospeum</i>	France : Nizon	12	AF367634							1	1c	1c	1cg			
<i>Paladilbia</i>	France : Baume Sanilhac	11	Prosel2056	coming soon						1	1c	1c	1ch		9	<i>B. roselloi</i>
<i>Paladilbia</i>	France : Sauve	9	P8		coming soon					2	2	2a	2a			
<i>Paladilbia</i>	France : Sauve	9	P11		coming soon					2	2	2a	2a			
<i>Paladilbia</i>	France : Sauve	9	P12		coming soon	coming soon				2	2	2a	2a	2a		
<i>Paladilbia</i>	France : Sauve	9	P14		coming soon					2	2	2a	2a			
<i>Paladilbia</i>	France : Sauve	9	P17			coming soon								2a		
<i>Paladilbia</i>	France : Sauve	9	P18			coming soon								2a	10	<i>P. geniezzi</i> n.sp.
<i>Paladilbia</i>	France : Sauve	9	P22		coming soon					2	2	2a	2a			
<i>Paladilbia</i>	France : Sauve	9	P24	coming soon		coming soon				2	2a	2a	2aa		2a	
<i>Paladilbia</i>	France : Sauve	9	P25	coming soon						2	2a	2a	2aa			
<i>Paladilbia</i>	France : Sauve	9	P15	coming soon		coming soon				2	2a	2a	2ab		2a	
<i>Paladilbia</i>	France : Sauve	9	P16	coming soon		coming soon				2	2a	2a	2ab		2a	
<i>Paladilbia</i>	France : Sauve	9	P20	coming soon		coming soon				2	2a	2a	2ab		2a	
<i>Paladilbia</i>	France : Trabuc	10	P68		coming soon	coming soon				2	2	2b	2b	2b		
<i>Paladilbia</i>	France : Trabuc	10	P93		coming soon	coming soon				2	2	2b	2b	2b		
<i>Paladilbia</i>	France : Trabuc	10	P96	coming soon						2	2b	2b	2ba			11
<i>Paladilbia</i>	France : Trabuc	10	P97	coming soon						2	2b	2b	2bb			
<i>Paladilbia</i>	France : Trabuc	10	P98	coming soon	coming soon					2	2b	2b	2bb			
<i>Paladilbia</i>	France : Lez	6	P2024	coming soon	coming soon	coming soon				2	2c	2c	2c	2b	12	<i>P. pleurotoma</i>
<i>Paladilbia</i>	France : Lez	6	P2025	coming soon	coming soon	coming soon				2	2c	2c	2c	2b		
<i>Paladilbia</i>	France : Fontenilles	4	P2066		coming soon	coming soon				2	2	2d	2d	2b	13	<i>P. martini</i> n.sp.
<i>Paladilbia</i>	France : Fontenilles	4	P2067		coming soon	coming soon				2	2	2d	2d	2b		
<i>Moitessiera</i>	France : Gour Noir	7	M2010	coming soon	coming soon					3	3	3a	3a		14	<i>M. rolandiana</i>
<i>Moitessiera</i>	France : Gour Noir	7	M2012	coming soon						3	3	3a	3a			
<i>Moitessiera</i>	France : Vis	2	M149	coming soon	coming soon					3	3	3b	3b		15	<i>M. tillierae</i> n.sp.
<i>Moitessiera</i>	France : Sauve	9	M31			coming soon								3c		
<i>Moitessiera</i>	France : Cabrier	3	M2001			coming soon								3c	16	<i>M. vasseuri</i> n.sp.
<i>Moitessiera</i>	France : Cabrier	3	M2002			coming soon								3c		
<i>Moitessiera</i>	France : Gloriette	1	M1320			coming soon								3d		
<i>Moitessiera</i>	France : Gloriette	1	M1321		coming soon	coming soon				3	3	3d	3d	3d	17	<i>M. girardii</i> n.sp.
<i>Moitessiera</i>	France : Gloriette	1	M1322			coming soon								3d		
<i>Moitessiera</i>	France : Gloriette	1	M2037			coming soon								3d		
<i>Spiralix</i>	France : La Prouesse	13		AF367635	EU573992					4	4	4	4	3	18	<i>S. puteana</i>

Morphometric analyses

In addition to the live specimens sequenced, shells unambiguously attributable to the *Moitessieria* genus were collected in four localities: twelve shells from the Lirou River hyporheic zone (close to the Gour Noir spring, Fig. 1, station 7); 25 shells from the Folatière cave (close to the Gourneyras cave where one specimen could be sequenced, Fig. 1, station 2); 18 shells from the Sauve Spring (Fig. 1, station 9, including one sequenced specimen) and 33 shells from the Cabrier cave (Fig. 1, station 3, including one sequenced specimen). The morphometric analyses were performed only for the *Moitessieria* because the other genera were not represented by enough shells in each locality to allow statistical analyses. Shells were placed on an adhesive support in a standard position, i.e with the columellar axis standing vertically, and then digitalized with a graduated scale using a stereomicroscope connected to a digital camera. Six parameters were recorded on each picture using ImageTool 3.00 [11]: height (H) and width (W) of the shell, width of the last suture (LSW), width of the last whorl (LWW), height and width of the aperture (AH, AW). These measures were log-transformed to minimize the size effect. Four ratios (H/W, H/LWW, AH/H, AH/AW) commonly used in the alpha-taxonomy of hydrobioid spring-snails [12-14] were calculated. We performed multivariate analyses (Principal Component Analysis, PCA) to explore the distribution of these ten shell parameters using R [15].

DNA analyses

The whole specimens were used for the extractions, as their small size did not allow taking the animal out of the shell. DNA was extracted using the Nucleospin Tissue Kit (marketed by Macherey–Nagel), following the manufacturer’s protocol. Four partial gene sequences were amplified: fragment of the cytochrome oxidase subunit I (COI) gene (barcode fragment); rRNA 16S gene; rDNA 28S gene and rDNA 18S. For the 18S gene, the preliminary results showed that this gene was not variable within families and it will not be dealt with anymore in this paper. Extractions, amplifications, and sequencing were performed by Genoscreen (France) and Eurofins (Germany) using universal primers and standard protocols (see [16, 17]). Primer pairs were newly designed when the universal primer failed to amplify the 16S gene: 16sF2: AGTCGAGCCTGCCAGTGA and 16sR2: CAACCCTTAAAGACTTCTGCATCCTT ; 16sF3: AGTCGRRCTGCCAGTGA and 16sR3: CAACCYTTAAAGACTTCTGCATCNTT. GenBank reference numbers are given in Table 1.

Additional sequences were downloaded from GenBank and included in the analyses: *Moitessieria cf. puteana* for CO1 and 16S ([2] and Wilke & Ponder, unpublished); *Bythiospeum* sp. from Wilke *et al.* (2001) and *Bythiospeum* spp. for COI ([2] and Hirsch *et al.* unpublished); and *Lithoglyphus naticoides* for CO1 [2] and 16S and 28S [18](see Table 2 for GenBank accession numbers). Sequences were automatically aligned using ClustalW multiple alignments implemented in BioEdit 7.0.5.3 [19]. The accuracy of automatic alignments was confirmed by eye. Only a few gaps, unambiguously aligned, were inferred for the 28S and 16S genes: they were conserved for the analyses.

Table 2: sequences available from GenBank and included in this paper

Taxon	Location	COI	16S	28S
<i>Bythiospeum quenstedti</i>	Falkensteiner_Hoehle_A	HM107113		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. quenstedti</i>	Falkensteiner_Hoehle_B	HM107114		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. quenstedti</i>	Falkensteiner_Hoehle_C	HM107115		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. suevicum</i>	Haugensteinmuehle_A	HM107116		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. suevicum</i>	Haugensteinmuehle_B	HM107117		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. suevicum</i>	Haugensteinmuehle_C	HM107118		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. acutum</i>	Teufelsklungen_Broeller A	HM107119		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. acutum</i>	Teufelsklungen_Broeller B	HM107120		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. acutum</i>	Teufelsklungen_Broeller C	HM107121		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. pellucidum</i>	Wendlingen_am_Neckar_A	HM107122		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. pellucidum</i>	Wendlingen_am_Neckar_B	HM107123		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. pellucidum</i>	Wendlingen_am_Neckar_C	HM107124		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. saxigenum</i>	Wulfbachquellhoehle_A	HM107125		Hirsch et al. (unpublished)
<i>Bythiospeum</i> sp.	Blautopf_A	HM107126		Hirsch et al. (unpublished)
<i>Bythiospeum</i> sp.	Wasserfraale_A	HM107127		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. francomontanum</i>	Source de la Serrière	HM107128		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. francomontanum</i>	Source de la Serrière	HM107129		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. francomontanum</i>	Source de la Cote au Bouvier	HM107130		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. francomontanum</i>	Source de la Cote au Bouvier	HM107131		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. francomontanum</i>	Source de la Raisette	HM107132		Hirsch et al. (unpublished)
<i>B. francomontanum</i>	Source de la Raisette	HM107133		Hirsch et al. (unpublished)
<i>Bythiospeum</i> sp.	Source de la Nizon	AF367634		Wilke et al. 2001
<i>Moitessieria</i> cf. <i>puteana</i>	Source de la Prouesse	AF367635.1		Wilke et al. 2001
<i>Moitessieria</i> cf. <i>puteana</i>	Source de la Prouesse		EU573992	Wilke & Ponder (unpublished)
<i>Lithoglyphus naticoides</i>		AF367642		Wilke et al. 2001
<i>Lithoglyphus naticoides</i>	Poland: Narew River near Drozdowo		FJ160287	FJ160290 Benke et al. 2009

Phylogenetic analyses

Lithoglyphus naticoides (C. Pfeiffer, 1828), Family Lithoglyphidae Tryon, 1866, Super-family Risssooidea J.E. Gray, 1847 was chosen as outgroup as it is the most closely related taxa to *Moitessieria* and *Bythiospeum* [2]. *Heraultiella exilis* (Paladilhe, 1867), Family Hydrobiidae Stimpson, 1865, Super-family Risssooidea, was chosen as distant outgroup to artificially root the tree.

Saturation was tested for the three codon positions of the COI gene, and the third position was proved to be largely homoplastic (results not shown): we thus defined three partitions (one for each codon position) for the COI gene in all subsequent Bayesian analyses (BI). BI analysis have been performed running two parallel analyses in MrBayes V 3.1.2 [20], consisting each of two Markov chains of 10,000,000 generations each, sampled every 1,000 generations (28S gene), 15,000,000 generations sampled every 5,000 generation (COI and 16S gene), and 30,000,000 generations sampled every 5,000 generation for the combined dataset, for which each gene and each codon position for the COI gene was treated as an unlinked partition. Convergence of the analysis was checked using Tracer V 1.4.1 [21]: all ESS values were >200 (default burnin). A consensus tree was then calculated after omitting the first 10% trees as burn-in.

Species delimitation

Morphometric analyses are the only tool currently used to distinguish Moitessieriidae species. However, it has been shown that mollusc shells were often misleading for discriminating species, as environmental condition can strongly affect their shape [16, 17, 22]. For the first time in the Moitessieriidae family, we

propose to test the species delimitation using molecular tools. We consider species as a network of organisms definitively divergent from the other ones [23, 24]. Several criteria of species delimitation can result from this definition [24] and we applied several of them in an integrative taxonomy framework to propose species hypotheses. Sequences were sorted into Primary Species Hypotheses (PSH) using the Automatic Barcode Gap Definition (ABGD) that seeks to identify in the pairwise distribution of genetic distances a gap that potentially correspond to a threshold between intra- and inter-specific distances [25]. The ABGD website (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>) were used for the analyses, with default parameters. The different partitions of species hypotheses provided by ABGD for each prior threshold of genetic distance were analyzed and confronted to other criteria and data (monophyly of the PSH, morphological variability, geographic distribution) to propose as robust as possible species hypotheses, knowing the available data.

Results

Morphometric analyses

PCA axes 1 and 2 represented respectively 64% and 23% of the variance. The four populations can be distinguished by these morphometric analyses, although populations from the Cabrier spring (station 3) and the Sauve cave (station 9) overlapped (Fig. 2).

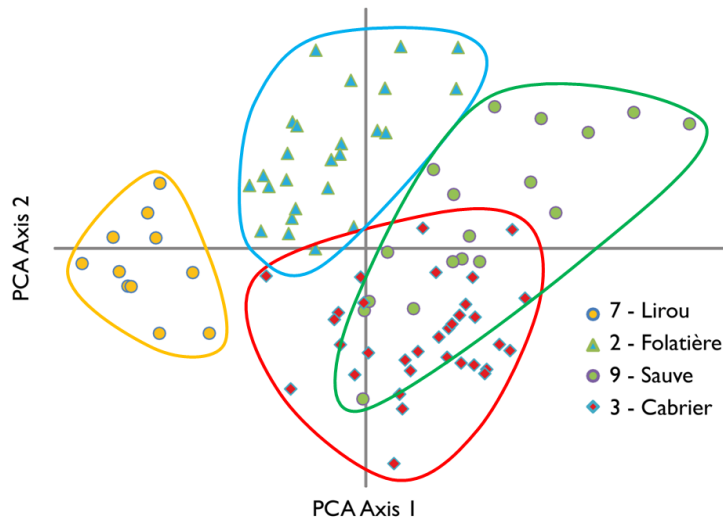


Figure 2: Projection of the specimens sampled on the axis 1 and 2 of the PCA.

Molecular analyses

If subterranean gastropods are difficult to sample, they are also difficult to amplify, maybe because DNA deteriorates rapidly in these unpigmented organisms once they are put into light. About 70% of the specimens collected alive could not be amplified for any of the targeted genes. For the remaining 30%, only one or two genes were successfully sequenced in most cases (Table 1). As a consequence, not all the sampled populations could be compared to one another for each gene fragment. However, for all the populations analyzed here, at least one of the three genes allowed proposing species hypothesis.

A total of 45 specimens, all from the Moitesseriidae family, could be amplified for at least one of the three targeted genes (24 specimens for one gene only; three for COI + 16S; seven for COI + 28S; six for 16S + 28S; five for the three genes), representing 13 specimens from the genus *Bythiospeum*; 10 from the genus *Moitessieria* and 21 for the genus *Paladilbia*. Bayesian analyses were performed with the following datasets: 47 COI sequences (including the 24 sequences downloaded from GenBank), 23 16S sequences (including one sequence downloaded from GenBank) and 26 28S sequences (see Table 2, Fig. 3-6 for details).

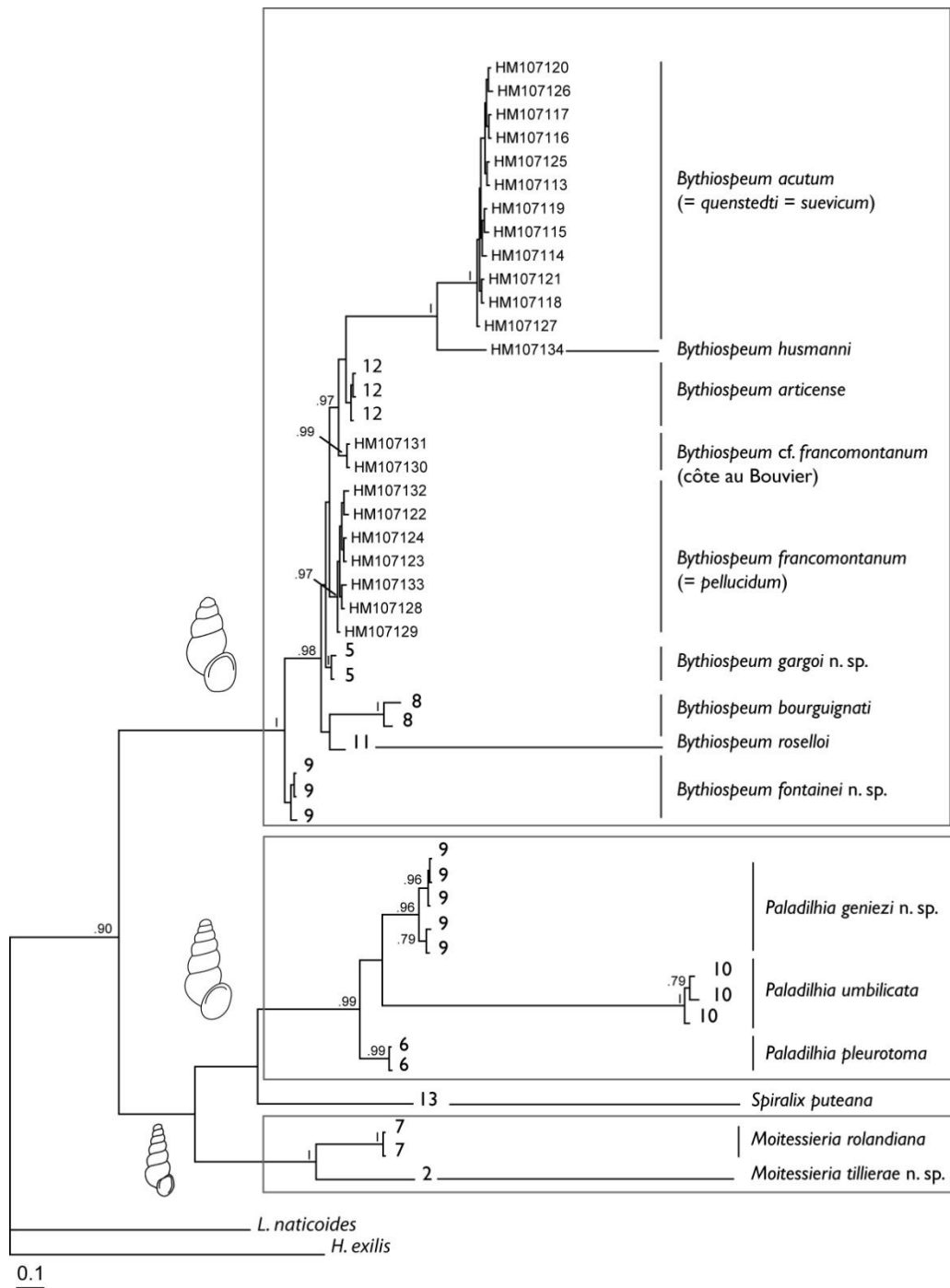


Fig. 3 Bayesian phylogenetic tree obtained from the COI gene fragment. Bayesian posterior probabilities (when >0.9) are provided above the nodes. The scale bar indicates the expected number of substitutions per site according to the model of sequence evolution applied. Branch numbers refer to the sampling sites (Tables 2, 3).

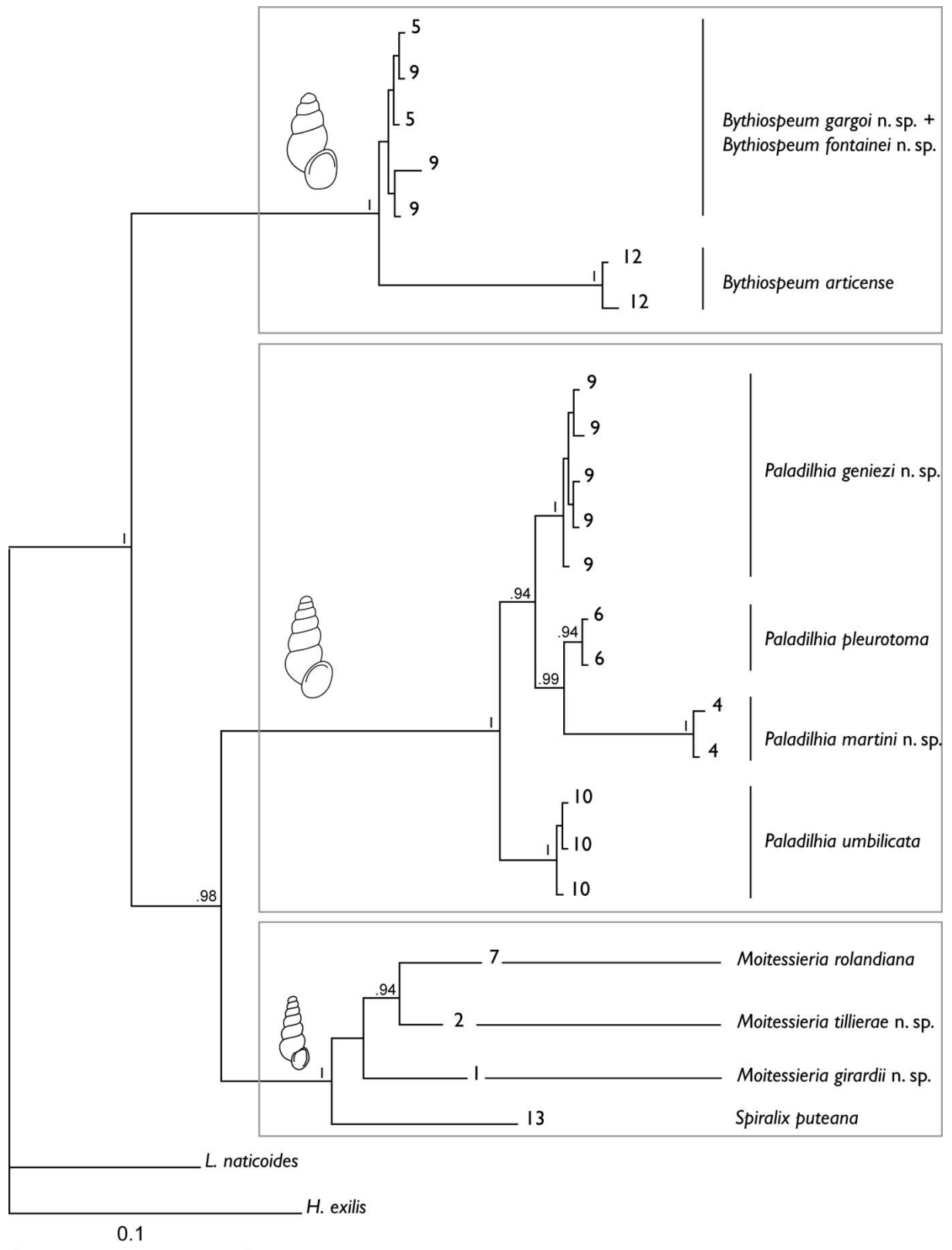


Figure 4: Bayesian phylogenetic tree obtained from the 16S gene fragments. Bayesian posterior probabilities (when >0.9) are provided above the nodes. The scale bar indicates the expected number of substitutions per site according to the model of sequence evolution applied. Branch numbers refer to the sampling sites (Tables 2, 3).

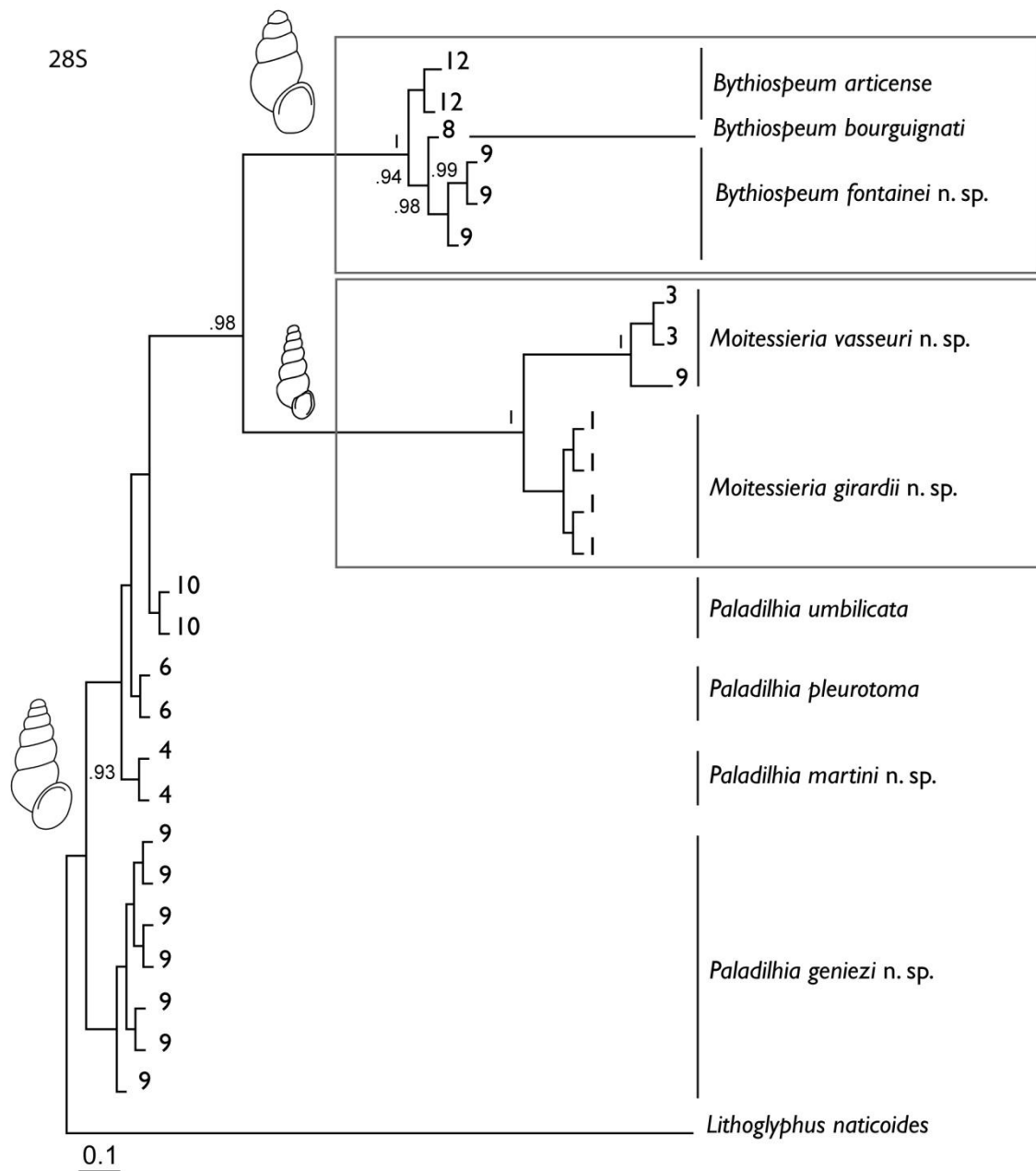


Figure 5: Bayesian phylogenetic tree obtained from the 28S gene fragments. Bayesian posterior probabilities (when >0.9) are provided above the nodes. The scale bar indicates the expected number of substitutions per site according to the model of sequence evolution applied. Branch numbers refer to the sampling sites (Tables 2, 3).

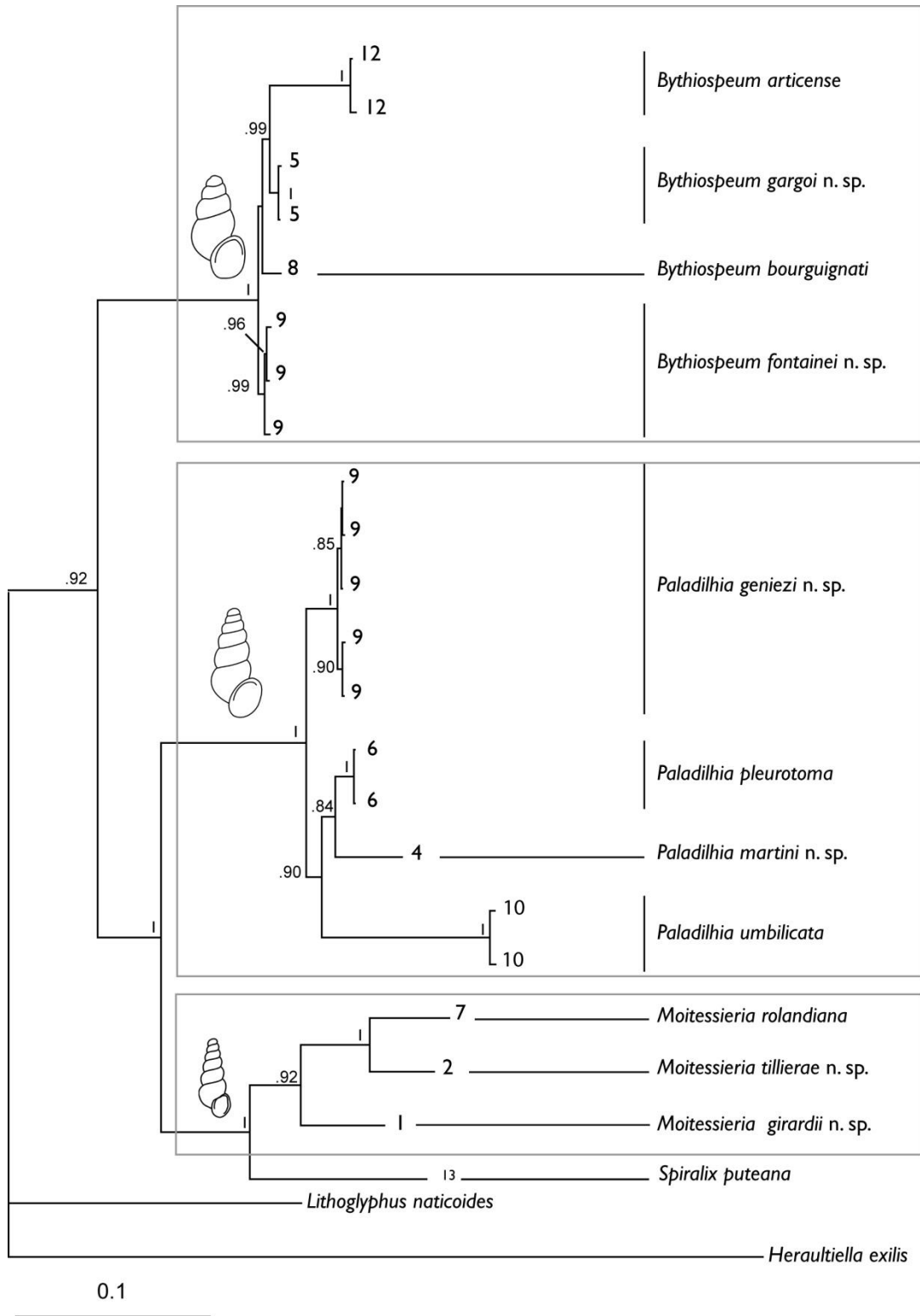


Figure 6: Bayesian phylogenetic tree obtained from the concatenated COI, 16S and 28S gene fragments. Node supports are indicated above branches. Branch numbers refer to the sampling sites (Tables 2, 3).

In all trees (COI, 16S, 28S), the three genera for which several specimens are included (*Bythiospeum*, *Moitessieria* and *Paladilbia*) are always found monophyletic and highly supported. Within each genus specimens from the same locality always cluster in the same clade (generally highly supported, except for the 28S gene – see Fig. 5), except the *Bythiospeum* specimens from the stations 5 and 9 for the 16S gene (Fig. 4). We thus combined DNA sequences from different specimens from the same genus and same station to build chimeric sequences and increase the number of sequences included in a concatenated dataset (no supported incongruence was found between the COI, 16S and 28S phylogenetic trees) that included specimens and chimeras with at least 2 genes over the three. Because this dataset includes chimeras built with COI, 16S and 28S sequences from different specimens, it will not be used to discuss the relationships between the specimens collected in the same locality, but only the relationships between the clades defined by the single-gene analyses that correspond each to a single locality. The resulting alignment was 1983 base pair long. While not all the localities could be included in this dataset (only one gene fragment could be amplified for the *Moitessieria* from the stations 9 and 3, for the *Bythiospeum* species from Germany and for *Paladilbia roselloi*), the phylogenetic tree supports the results obtained by each gene fragment independently, with all the specimens from a single locality in each genus clustering in a supported clade or forming an independent lineage (when only one specimen or chimera was available) (Fig. 6).

Species delimitation

While genera can be easily distinguished by eye, identifying species from the shell morphology is not straightforward. Moreover, morphological differences could be linked to different environmental conditions. We thus relied on the genetic distances between specimens to propose Primary Species Hypotheses (PSH). The Automatic Barcode Gap Definition (ABGD) [25] proposed four different partitions for each mitochondrial gene, and only one for the 28S gene (Table 1).

For the COI gene, the threshold between intra- and inter-PSH genetic distances range from 0.7% (19 PSH) to 19% (four PSH). According to the morphological data, the partition 1, with four PSHs (Table 1), would correspond to the generic level (provided "*Moitessieria puteana*" [2] is considered to belong to a distinct genus, *Spiralix*). The partition 2 distinguishes three PSH within the *Bythiospeum* and *Paladilbia* genera, and none within the *Moitessieria* genus, while the partition 3 distinguishes two PSH in the *Moitessieria* genus (specimens from stations 2 and 7 are distinguished, in agreement with the results of the morphological analysis). The partition 4 defined ten PSH for the genus *Bythiospeum*, five for the genus *Paladilbia* and two for the genus *Moitessieria*, some of them being not supported (PSH 1cf, 1cg, 2aa, 2bb – Table 1). The partition 4 implies that different species of the same genus can be found in the same locality: two *Bythiospeum* PSH being found in the Cadoule spring (station 8) and two *Paladilbia* PSH in the Sauve cave (station 9) as well as in the Trabuc cave (station 10).

For 16S, the partition 1 also corresponds to the generic level, but the genera *Spiralix* and *Moitessieria* are not distinguished. The partition 2 does not distinguish PSH within the *Paladilbia* and *Moitessieria-Spiralix* genera, but finds two PSH within the *Bythiospeum* from France (specimens from station 12 vs specimens from stations 5 and 9). The partition 3 conserves the *Bythiospeum* hypotheses but adds a distinction between each *Moitessieria* (3 PSH, where specimens from stations 2 and 7 are distinguished, once again in agreement with the results of the morphological analysis) and *Paladilbia* (4 PSH) populations and therefore recognizes the accepted *Paladilbia* species. The partition 4 furthermore isolates one of the specimens of *Bythiospeum* from Sauve cave (station 9), leaving the other specimens from the same station in another PSH together with two specimens from the station 5.

The partition obtained with the 28S only distinguishes the genera, except two PSH defined within *Moitessieria*, one including the specimens from the station 1, the other the specimens from the stations 3 and 9. Specimens from the stations 3 and 9 are thus not distinguished, in agreement with the morphological analysis.

The lack of a variable nuclear marker does not allow confirming or infirming the hypotheses proposed with the mitochondrial COI and 16S genes. However, the evaluation of the partitions proposed by ABGD using the genetic distances, the phylogenetic analyses and the morphological and geographical data support the hypothesis that the partition 1, as defined by ABGD, corresponds to the genus level. At the species level, results are more difficult to interpret. In several cases, the PSH proposed by ABGD are consistent with the geography and with the morphological results, i.e. specimens from the same locality

are clustered in a single PSH. In most cases, these PSH also correspond to supported clades, which is not always true for PSH defined in other partition that would not include only specimens from the same locality. This is also consistent with the literature, since we have no evidence of two Moitessieriidae species of the same genus occurring in the same locality (with one exception [26] unconfirmed by further studies). However, in the genus *Bythiospeum*, PSH defined by ABGD that include only specimens from the same locality are separated by very low genetic distances on the COI gene (c.a. 1%), largely below the generally accepted genetic distance between hydrobioïd species (which is around 3%, [14, 27-29]). The alternate PSH proposed by ABGD would cluster all the specimens from the locality 5, 8, 9, 11 and specimens from GenBank identified as *B. francmontanum*. This group is furthermore not monophyletic.

Finally, the species hypotheses retained are the following: one species hypotheses in the genus *Spiralix*, four in the genus *Moitessieria* (specimens from the stations 1, 2, 7 separated in three species, and specimens from stations 3 et 9 grouped in a single one), four in the genus *Paladilbia* (specimens from the stations 4, 6, 9 and 10 separated in four species) and nine species for the genus *Bythiospeum* (four species in Germany, specimens from the stations 5, 8, 9, 11 and 12 separated in five species).

In a last step, we linked each species hypothesis a taxonomic name, when available, based on the position of the specimens from type localities (Table 1). Sampling topotypes is in principle the most reliable approach to evaluate the status of a nominal species, when type-specimens cannot be sequenced. Indeed, contrary to the surface ecosystems, subterranean hydrology has not suffered from anthropogenic perturbations such as connecting drainages via channel (which is a key issue for epigeal freshwater molluscs[16, 17], and dispersion capacity of stygobite snails should have remain unchanged for centuries. Following this approach, seven species hypotheses could not be linked to a name. One species, described as *Paladilbia roselloi*, actually clusters in the *Bythiospeum* clade.

Discussion

Taxonomic issues

Most Moitessieriids are considered endemic to France, but some *Spiralix* species have been described from Spain [30]; *Moitessieria* species occur in Spain and Italy [30-33]; *Bythiospeum* has a large distribution in Europe, from France to Ukraine according to the Fauna Europaea Database [<http://www.faunaeur.org>]. The monophyly of the family was confirmed by all the targeted genes. The position of the genus *Bythiospeum* (Moitessieriidae vs Hydrobiidae) has been subject to controversial opinions [2, 32-36]. According to the published molecular phylogenies [2, 37, 38], the genus *Bythiospeum* should be included in the Moitessieriidae family. Our results support this affiliation.

Considering that genetic divergences are a consequence of reproductive isolation, following the Lineage Species Concept, and because these genetic divergences are congruent with biogeography, we propose to consider each PSH as a distinct species. Although we lack support from an unlinked genetic marker (as 28S and 18S genes were not variable at the species level) this opinion is supported by morphometric analyses in the case of the *Moitessieria* genus, by the COI genetic divergences in the genera *Paladilbia* and *Moitessieria* which were above the admitted species level for hydrobioids [27-29] and by the monophyly of the specimens collected in each locality. Among the 18 delimited species in the family Moitessieriidae, four were mined from GenBank and were already named. Our results suggest that at least some specimens attributed to different species should be unambiguously synonymized and only four species should be considered: *B. acutum* (Geyer, 1904), *B. suevicum* (Geyer, 1905) and *B. quenstedti* (Wiedersheim, 1873) should be synonymized under the name *B. quenstedti* (Wiedersheim, 1873); *B. francomontanum* Bernasconi, 1973 and *B. pellucidum* (Seckendorf, 1846) should be synonymized under the name *B. pellucidum* (Seckendorf, 1846) and *B. cf. francomontanum* from France (côte au Bouvier) should be considered as a distinct species hypothesis.

Among the 14 French species, seven were sampled in the type localities of *P. pleurotoma*, *P. umbilicata*, *P. roselloi* and *M. rolandiana* or close to the type-locality of *B. bourguignati* and *B. articense*. *Bythiospeum articense* is described from the Ardèche River, a tributary of the Rhône River, a few tens of kilometers north of the Nizon Spring (station 12). *Bythiospeum klemmi* is also found in karstic areas close to the Nizon Spring but exhibits strong morphological divergences (small globular shell), suggesting it belongs to a distinct taxon. The type locality of *B. bourguignati* is in the Lez River, close to the station 8. The *P. roselloi* COI sequence clustered within the *Bythiospeum* genus, which suggested it should be re-assigned to the *Bythiospeum* genus. Indeed, in the original description, the author remarks that the absence of pallial tentacle and the shape of the operculum do not correspond to the genus *Paladilbia* which raises a doubt concerning the generic attribution of this species [39]. Based on molecular data, we here propose to re-assign this species to the genus *Bythiospeum*. Hence, its proper name should be *Bythiospeum roselloi* (Girardi, 2003). As such, the *Bythiospeum* genus monophyly was supported by the COI, 16S and 28S fragments analyses. The genus *Paladilbia* is endemic to southern France, from the west bank of the Rhône River to the east bank of the Hérault River, with a single isolated occurrence in the Atlantic drainage [40]. The *Paladilbia* genus monophyly was confirmed by the COI and 16S gene fragments analyses, but remained unresolved with the 28S'. *Paladilbia pleurotoma* was described from the Lez alluviums, near Montpellier. It is considered to live in karstic drainages between the western tributaries of the Rhône River and the eastern tributaries of the Hérault River. Topotypes were collected from the Lez Spring (station 6). *Paladilbia umbilicata* was described from the Trabuc Cave, lying within the Rhône drainage. Topotypes were sampled from this cave (station 10). *Moitessieria rolandiana* is considered as a widespread species, occurring from the western tributaries of the Rhône River to the Garonne drainage [1]. It was described from the alluviums of the Mosson River, a tributary of the Lez River, and has no precise type locality. Specimens sampled in a spring lying within the Lirou River (station 7), a tributary of the Lez River, can be considered as topotypes.

The only specimen ever sampled and amplified for the genus *Spiralix* was provisionally named *Moitessieria cf. puteana* [2]. "*Moitessieria puteana*" is now considered to belong to the genus *Spiralix* [35]. Indeed, this specimen was found to be highly divergent from the *Moitessieria* specimens sampled for both COI and 16S genes.

Finally, seven species hypotheses were not linked to available names: they are described as new species in the supplementary material.

Conservation issues

Conservation policies for stygobite snails rely mostly on a list of protected taxa, although the subterranean habitat is also considered of Community Interest by the European Habitat Directive (habitat number 8310-4 for the aquatic ecosystems). Eighteen species of stygobite molluscs are currently protected by the French law. However, when comparing this protected species list with the IUCN red list categorization ([41], table 4), it appears that the most vulnerable species are not targeted by conservation policies, and that most protected species are not threatened according to the IUCN criteria. This paradox is rooted in the early conservation papers that considered the known conservation units at these times, and ranked them based on their restricted ranges [42]. Increasing taxonomic knowledge has highlighted even more restricted-ranged and threatened conservation units, which have not yet been considered in the conservation policies.

In this paper, we show that within the currently accepted species, new taxa have to be described as each sampled cohesive hydrogeological network host highly divergent evolutionary units. Although incomplete, our sampling in subterranean habitats within a restricted geographic scale highlights an unnoticed cryptic biodiversity and further studies should allow describing many more taxa. By sampling extensively a restricted area, and using modern tools, we have open up a Pandora's box, outstanding the current conservation units considered for other groups. Stygobite mollusks' alpha-diversity is probably underestimated at a larger scale and all the identified species hypotheses described here should arguably be categorized as vulnerable or threatened due to their restricted range and the human pressure on both water resources and organic matter income (Prié *et al.* submitted, [ARTICLE 9](#)). Although extrapolating these results at a larger scale is delicate, it seems obvious that the aquatic subterranean habitat hosts many evolutionary units that are still unknown. The pace of new species descriptions supports this hypothesis.

In an ideal world, an increasing list of restricted-ranged and threatened taxa should end up with an increasing list of protected species. But increasing protected species lists would end up in bushy regulation texts, and because specialists are very few, it would make them non-operational for conservation policies. Conservation policies rely on (i) lists of protected taxa and (ii) lists of protected habitats. While protected taxa's lists do not target the most vulnerable species and are obsolete, the subterranean habitat is listed in the EU Habitat directive as of Community Interest. Fostering on the protection of subterranean habitat would be more efficient than listing each evolutionary unit identified within the European karstic areas as isolated conservation units.

What management measures should be set up to protect the subterranean habitat? Prié *et al.* (submitted, [ARTICLE 9](#)) show that organic matter income is the driving force for subterranean mollusks biodiversity (see also [43]). Promoting the forest cover that prevailed before the Neolithic, when these subterranean faunas were established, is probably the best way to sustain stygobite ecosystems as forest provides a better organic matter income than barred open grassland landscapes.

What are the current conservation management priorities in southern France? Open grassland for charismatic species such as orchids, Bonelli's eagle or reptiles; which provides lower organic matter income to the karstic networks. Conservation policies targeting widespread charismatic species are facing the risk of causing the extinction of micro-endemic species. While a lot of money is being spent for conservation purposes, we will continue losing species currently still present in the checklists. Paradoxically, ongoing expensive conservation policies may significantly contribute to biodiversity erosion.

Table 4: French stygobite molluscs conservation priorities and policies: IUCN categories versus protected species (data deficient species not shown).

Espèce	Statut IUCN	Protection en France
<i>Bythinella eutrepha</i>	CR	
<i>Henrigirardia wienini</i>	CR	
<i>Bythiospeum klemmi</i>	EN	
<i>Alzoniella perrisii</i>	EN	
<i>Alzoniella elliptica</i>	EN	
<i>Plagigeyeria deformata</i>	EN	
<i>Moitessieria heideae</i>	EN	
<i>Paladilhia umbilicata</i>	EN	
<i>Paladilhia gloeeri</i>	EN	
<i>Heraultiella exilis</i>	VU	X
<i>Bythinella padiraci</i>	VU	
<i>Bythinella galerae</i>	VU	
<i>Palacanthilhiopsis vervierii</i>	VU	X
<i>Palaospeum bessoni</i>	VU	
<i>Palaospeum nanum</i>	VU	
<i>Moitessieria massoti</i>	VU	
<i>Moitessieria nezi</i>	VU	
<i>Moitessieria calloti</i>	VU	
<i>Moitessieria juvenisanguis</i>	VU	
<i>Paladilhia jamblussensis</i>	VU	
<i>Paladilhia roselloi</i>	VU	
<i>Avenionia brevis</i>	LC	X
<i>Avenionia berenguieri</i>	LC	
<i>Fissuria boui</i>	LC	X
<i>Bythiospeum diaphanum</i>	LC	X
<i>Bythiospeum garnieri</i>	LC	X
<i>Bythiospeum bourguignati</i>	LC	X
<i>Bythiospeum bressanum</i>	LC	X
<i>Bythiospeum diaphanoides</i>	LC	
<i>Bythiospeum charpyi</i>	LC	
<i>Bythiospeum articense</i>	LC	X
<i>Islamia moquiniana</i>	LC	
<i>Islamia minuta</i>	LC	X
<i>Moitessieria simoniana</i>	LC	X
<i>Moitessieria locardi</i>	LC	X
<i>Moitessieria lescherae</i>	LC	
<i>Moitessieria rolandiana</i>	LC	X
<i>Paladilhia conica</i>	LC	
<i>Paladilhia pleurotoma</i>	LC	X
<i>Spiralix vitrea</i>	LC	
<i>Spiralix rayi</i>	LC	X

Acknowledgments

We are grateful to all the people involved in the sampling effort, noticeably Frank Vasseur and Henri Callot-Girardi. We also wish to thank Christelle Guilhe-Batiot, Hervé Jourde and Bernard Ladouche for their helpful information on hydrogeology. This study was performed with financial support of Biotope Consultancy.

References

1. Bertrand A: **Atlas préliminaire de répartition géographique des mollusques souterrains de France (Mollusca : Rissoidea : Caenogastropoda)**. *Documents malacologiques* 2004, Hors série n°2:82.
2. Wilke T, Davis GM, Falniovski A, Giusti F, Bodon M, Magdalena S: **Molecular systematics of Hydrobiidae (Mollusca: Gastropoda: Rissooidea): testing monophyly and phylogenetic relationships**. *Proceedings of the Academy of Natural Science of Philadelphia* 2001, **15**:1–21.
3. Gargominy O, Prié V, Bichain J-M, Cucherat X, Fontaine B: **Liste de référence annotée des mollusques continentaux de France**. *MalaCo* 2011, **7**:307-382.
4. Callot-Girardi H: ***Bythiospeum nemausense* sp. nov. (Gastropoda: Hydrobiidae), un nouveau mollusque stygobite de la Fontaine de Nîmes (Gard, France)**. *Spira* 2012, **4**:161-168.
5. Malard F, Gibert J, Laurent R: **L'aquifère de la source du Lez : un réservoir d'eau ... et de biodiversité**. *Karstologia* 1997, **30**:49-54.
6. Culver D, Sket B: **Hotspots of subterranean biodiversity in caves and wells**. *Journal of Cave and Karst Studies* 2000, **62**:11-17.
7. Ferreira D: **Biodiversité aquatique souterraine de France : Base de données, patrons de distribution et implications en termes de conservation**. Université Claude Bernard - Lyon, 2005.
8. Fontaine B, van Achtenberg K, Alonso-Zarazaga MA, Araujo R, Asche M, Aspöck H, Aspöck U, Audisio P, Aukema B, Bailly N, et al: **New Species in the Old World: Europe as a Frontier in Biodiversity Exploration, a Test Bed for 21st Century Taxonomy**. *PLoS ONE* 2012, **7**:e36881.
9. Bou C, Rouch R: **Un nouveau champ de recherche sur la faune aquatique souterraine**. *Comptes Rendus de l'académie des sciences de Paris* 1967, **265**:369 - 370.
10. Fukuda H, Haga T, Tatara Y: **Niku-nuki: a useful method for anatomical and DNA studies on shell-bearing**. *Zoosymposia* 2008, **1**:15-38.
11. Wilcox D, Dove B, McDavid D, Greer D: **Image Tool for Windows version 3.00**. (UTHSCA ed. San Antonio: UTHSCA; 2002.
12. Bernasconi R: **Révision du genre *Bythinella* (Moquin-Tandon, 1855) de la France du Centre-Ouest, du Midi et des Pyrénées (Gastropoda Prosobranchia Hydrobiidae : Amnicolinae Bythinellini)**. *Documents malacologiques* 2000, n° sp.:126.
13. Haase M, Gargominy O, Fontaine B: **Rissoidean freshwater gastropods from the middle of the Pacific: the genus *Fluviopupa* on the Austral Islands (Caenogastropoda)**. *Molluscan Research* 2005, **25**.
14. Prié V, Bichain J-M: **Phylogenetic relationships and description of a new stygobite species of *Bythinella* (Mollusca, Gastropoda, Caenogastropoda, Amnicolidae) from southern France**. *Zoosystema* 2009, **31** 987-1000.
15. Team RDC: **R: A language and environment for statistical computing**. (Computing RfFS ed. Vienna; 2008.

16. Prié V, Puillandre N, Bouchet P: **Bad taxonomy can kill: molecular reevaluation of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Unionidae) and its accepted subspecies.** *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 2012, **405**:18.
17. Prié V, Puillandre N: **Molecular phylogeny, taxonomy and distribution of French *Unio* species (Bivalvia, Unionidae).** *Hydrobiologia* 2013.
18. Benke M, Brändle M, Albrecht C, Wilke T: **Pleistocene phylogeography and phylogenetic concordance in cold-adapted spring snails (*Bythinella* spp.).** *Molecular Ecology* 2009, **18**:890-903.
19. Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucleic Acids Symposium* 1999, **41**:95-98.
20. Huelsenbeck J, Ronquist F: **Bayesian inference of phylogeny.** *Bioinformatics* 2001, **17**:754 - 755.
21. Rambaut A, Drummond AJ: **Tracer v1.4.** available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. 2007.
22. Bichain J-M, Gaubert P, Samadi S, Boisselier-Dubayle M-C: **A gleam in the dark: Phylogenetic species delimitation in the confusing spring-snail genus *Bythinella* Moquin-Tandon, 1856 (Gastropoda: Rissoidae: Amnicolidae).** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2007, **45** 927-941.
23. de Queiroz K: **The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation - a conceptual unification and terminological recommendations.** In *Endless forms Species and speciation*. Edited by Howard DJ, Berlocher SH. Oxford: Oxford University Press; 1998: 57-75
24. Samadi S, Barberousse A: **The tree, the network, and the species.** *Biological Journal of the Linnean Society* 2006, **89**:509-521.
25. Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G: **ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation.** *Molecular Ecology* 2011, **21**:1864-1877.
26. Girardi H: ***Paladilhia subconica* et *Paladilhia magnanae*, nouvelles espèces de la grotte des Châtaigniers à Saint-Martin-de-Londres, Hérault, France et autres observations sur les *Moitessieria* (Mollusca : Caenogastropoda : Moitessieriidae).** *Documents Malacologiques* 2009, Hors-série n° 3:109-118.
27. Hershler R, Liu H-P, Mulvey M: **Phylogenetic relationships within the aquatic snail genus *Tryonia*: implications for Biogeography of the North American Southwest.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1999, **13**:377-391.
28. Liu HP, Hershler R, Clift K: **Mitochondrial DNA sequences reveal extensive cryptic diversity within a western American springsnail.** *Molecular Ecology* 2003, **12**:2771-2782.
29. Hurt CR: **Genetic divergence, population structure and historical demography of rare springsnails (*Pyrgulopsis*) in the lower Colorado River basin.** *Molecular Ecology* 2004, **13**:1173-1187.
30. Boeters HD: **Supplementary notes on Moitessieridae und Hydrobiidae from the Iberian Peninsula (Gastropoda, Caenogastropoda).** *Basteria* 2003, **67**:1-41.
31. Boeters HD: **Westeuropäische Moitessieriidae, 2) und Westeuropäische Hydrobiidae, 7). Moitessieriidae und Hydrobiidae in Spanien und Portugal.** *Archiv für Molluskenkunde* 1988, **118**:181-261.
32. Bodon M, Giusti F: **The genus *Moitessiera* in the Island of Sardinia and in Italy new data on the systematics of *Moitessiera* and *Paladilhia* (Prosobranchia: Hydrobiidae) (Studies on the Sardinian and Corsican malacofauna, IX).** *Malacologia* 1991, **33**:1-30.
33. Manganelli G, Bodon M, Cianfanelli S, Talenti E, Giusti F: **New hydrobiids from subterranean waters of eastern Sardinia, Italy (Gastropoda Prosobranchia: Hydrobiidae).** *Basteria* 1998, **62**:43-67.
34. Boeters HD, Gittenberger, E.: **Once more on the Moitessieriidae (Gastropoda, Prosobranchia), with the description of *Claemia brooki* gen. et spec. nov.** *Basteria* 1990, **54**:123-129.
35. Falkner G, Ripken TEJ, Falkner M: **Mollusques continentaux de la France. Liste de référence annotée et bibliographie.** *Patrimoine Naturels* 2002, **52**:1-350.

36. Boeters HD: **Supplementary notes on the Moitessieridae and Hydrobiidae from the Iberian peninsula (Gastropoda, Caenogastropoda).** *Basteria* 2003, **67**:1-41.
37. Criscione F, Ponder WF: **A phylogenetic analysis of rissoid and cingulopsoidean families (Gastropoda: Caenogastropoda).** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2013, **66**:1075-1082.
38. Wilke T, Haase M, Hershler R, Liu HP, Misof B, Ponder W: **Pushing short DNA fragments to the limit: Phylogenetic relationships of 'hydrobioid' gastropods (Caenogastropoda: Rissoidae).** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2013, **66**:715-736.
39. Girardi H: ***Paladilhia roselloi* (Gastropoda, Moitessieridae) espèce nouvelle des eaux souterraines de la Gardonnenque (Gard, France).** *Documents malacologiques* 2003, **4**:71-74.
40. Bertrand A: ***Paladilhia jamblussensis* (Gastropoda : Moitessieriidae) espèce nouvelle du Quercy.** *Documents Malacologiques* 2003, **4**:37-39.
41. Cuttelod A, Seddon M, Neubert E: **European Red List of Non-marine Molluscs.** (IUCN ed. pp. 97. Luxembourg: Publications Office of the European Union.; 2011:97.
42. Bouchet P: **La malacofaune française: Endémisme, Patrimoine naturel et Protection.** *Revue d'Ecologie (la Terre et la Vie)* 1990, **45**:259-288.
43. Gibert J, Deharveng L: **Subterranean ecosystems: a truncated functional biodiversity.** *BioScience* 2002, **52**:473-481.

Supplementary material: New species description

New species descriptions are still in progress. Only one partial species description is presented here.

Because the shells have been crushed during the extraction process, holotypes will be DNA extractions, and paratypes will be shells collected in the same station.

Paladilbia geniezji n. sp.

Description

Shell – Teleoconch conical and variably elongate, spire formed by c. six well convex whorls, gradually increasing, separated by deep sutures (Fig. 7 G-I). The shell width is c. $\frac{2}{3}$ of the shell length and the last whorl is more than $\frac{2}{3}$ of the shell length. Shell is transparent, with marked growth lines in the form of collabral grooves but no visible spiral micro-sculpture. Aperture holostome, oval; external margin of peristome slightly fluted. Umbilicus is widely open. Aperture could be rejected on the side, giving the shell a distinct globular shape. Operculum is thin, pliable, transparent and oval. Protoconch of $1\frac{1}{4}$ whorls, almost smooth, but exhibits thin spiral micro-sculptures in the form of shallow grooves. Basic statistics of 11 shell parameters from 35 shells are given in Table XXX.

Anatomy – The entire body is unpigmented. Eyes are invisible externally. Snout is about as long as wide, approximately parallel-sided or slightly tapered, with a weak but noticeable distal lobation. Tentacles are longer than the snout, more than 10 times as long as they are wide with the distal end slightly expanded.

Etymology

This species is dedicated to Philippe Geniez, a French naturalist well known for its excellence in various domains, who introduced me (V. P.), 10 years ago, to Mediterranean snails, one of the few groups he knows inside out.

Ecology

The only known living population comes from the Sauve spring. Living animals were found in shallow water, in small streams, sometimes very close to the cave entry. In summer, water temperature is around 14°C; pH about 7,3 ; conductivity 520 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Mg/Ca is low (min: 0,62; max : 2,40; mean: 1,03) indicating fast infiltrating surface waters.

Distinctive characters

Paladilbia species are highly variable in shape and, in most cases, cannot be distinguished to one another by shell shape only. However, *P. geniezji* has generally more rounded whorls than *P. pleurotoma*, with a slender shell shape, and the pleurotomoidal slot is less pronounced. Main differences rely on genetic

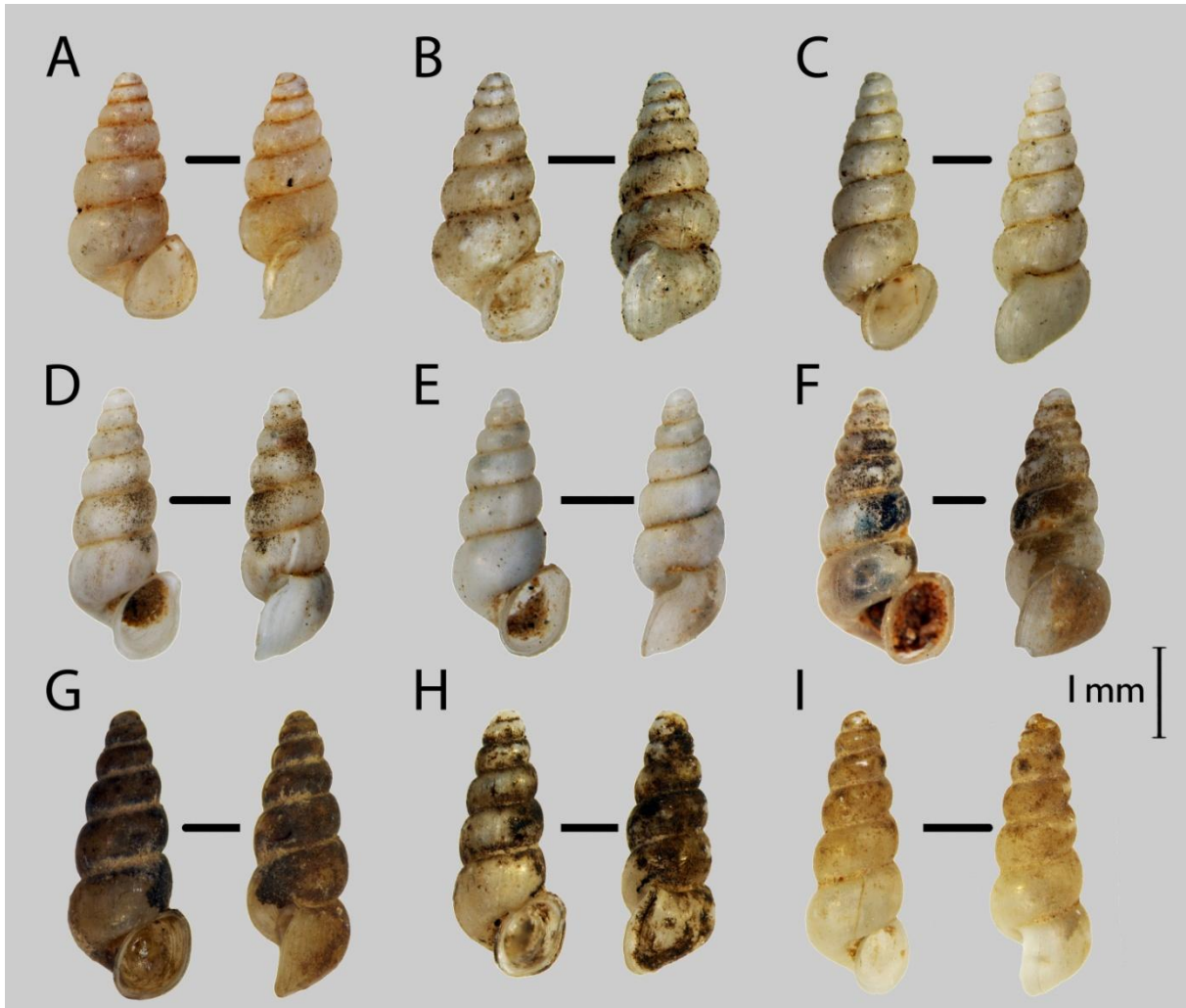


Figure 7: *Paladilhia pleurotoma* (A, B: type specimens from the Paladilhe collection in Montpellier; D-F: topotypes collected in 2012) and *P. geniezi* n. sp. (G-I: syntypes).

III.4 TEST D'AMPLIFICATION DE L'ADN ENVIRONNEMENTAL SOUTERRAIN

Les organismes aquatiques rejettent dans le milieu de petites quantités d'ADN. Cet ADN, dit ADN environnemental, devient amplifiable avec les progrès des techniques de séquençage et peut permettre d'inventorier les espèces présentes (ex. Ficetola *et al.* 2008 ; Déjean *et al.* 2011 ; Thomsen *et al.* 2011). L'ADN environnemental se détériore rapidement à cause notamment des ultra-violets. On peut penser que le milieu souterrain permet une meilleure préservation de cet ADN. Etant donné sa difficulté d'accès, et la difficulté d'y collecter des spécimens vivants, une méthode d'inventaire par ADN environnemental semblait prometteuse. Nous avons réalisé un premier test avec l'entreprise SpyGen ® et un financement du BRGM.

III.4.1 Matériel et méthodes

Dix-huit prélèvements de 1L d'eau ont été réalisés dans différentes sources du nord-montpelliérain appartenant à 9 hydrosystèmes distincts (SANDRE, 2007). J'ai effectué plusieurs réplicats : collecte d'échantillons au niveau de l'exutoire et au sein de la cavité dans la grotte de la Tuilède ; collecte de deux échantillons au niveau du même exutoire à Aniane et à la source du Lez, collecte d'échantillons dans trois sources du Lamalou étroitement connectées (Fig. 38).

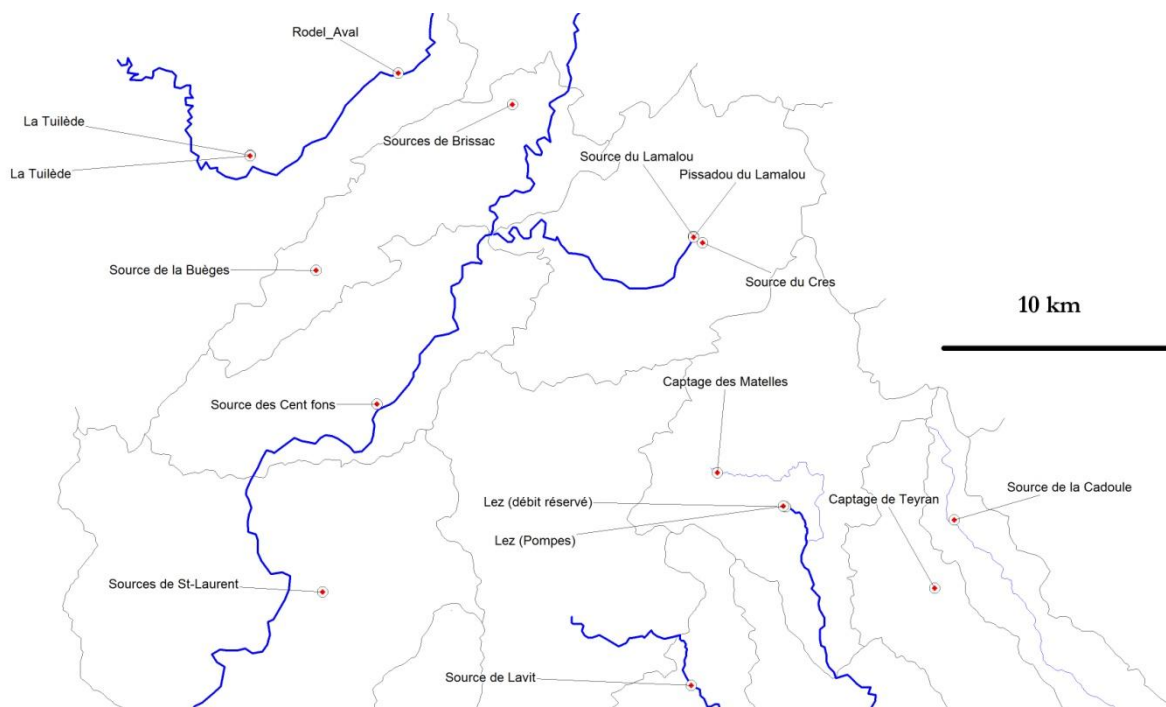


Figure 38 : localisation des prélèvements effectués pour analyser l'ADN environnemental du milieu souterrain. Les lignes bleues représentent les cours d'eau, les lignes noires représentent la délimitation des zones hydrologiques selon la base de données du SANDRE (2007).

Les analyses ont été confiées à l'entreprise SpyGen. Elles ont été effectuées en suivant le protocole Ficetola *et al.* 2008. Les extractions ont été réalisées dans une salle dédiée à l'ADN rare ou dégradé. Des contrôles négatifs ont été analysés simultanément, à chaque étape du protocole, afin de contrôler la pureté des consommables utilisés et de détecter des contaminations croisées au cours de la manipulation. L'amplification de l'ADN a été effectuée avec un couple d'amorces universelles pour les Mollusques & Arthropodes développée par SpyGen. Une amorce de blocage pour l'ADN de Mammifères a également été utilisée. Pour chaque échantillon, 16 réplicats PCR ont été effectués. Les fragments ADN amplifiés ont été séquencés à l'aide d'un séquenceur nouvelle génération Roche 454 GS FLX Titanium.

III.4.2 Résultats

Les résultats des amplifications sont inégaux, que ce soit entre les réplicats ou entre les différentes PCR (Tableau II), témoignant d'un protocole d'échantillonnage des eaux inadapté (puisque non répliquable).

Cinquante-six fragments de séquences différents ont été obtenus. Trois fragments de séquences appartenant au genre *Nipharagus* (Crustacea) ont été identifiés, mais aucune de ces 56 séquences n'a pu être identifiée au niveau spécifique, ni en utilisant le BLAST de GenBank, ni en les comparant avec mes propres séquences de mollusques souterrains. Je n'ai donc pas obtenu de séquences de gastéropodes stygobies, bien que les échantillonnages traditionnels aient permis d'en récolter plusieurs espèces dans ces différents compartiments hydrogéologiques.

Tableau II : résultats des différentes PCR menées sur les extractions des prélèvements d'eau réalisés (concentrations, en ng/μl). Une case vide signifie qu'aucune amplification n'a été obtenue. Les valeurs significatives sont surlignées en jaune.

	Tuilède (extérieur)	Tuilède (Souterrain)	Lez, débit réservé (extérieur, courant)	Lez (intérieur au niveau des pompes)	Source Aniane 1 (extérieur, courant)	Source Aniane 2 (extérieur, courant)	Lamalou vasque amont	Lamalou pissadou aval	Crès (ext. vasque peu courante)	Source Lavit (vasque extérieure)	Source Cabrier (extérieur, courant)	Source Cadoule (extérieur, courant)	Rodel (Souterrain)	Brissac (extérieur, courant)	Bièges (extérieur, vasque peu courante)	Matelles (Captage)	Teyran (Captage)	Cent fons (extérieur, courant)	
Répétitions PCR	1			3,21		6,82			8,61	7,1	3,05				6,25		2,42	9,92	
	2			5,1					9,5	3,53					8,03		4,67		
	3	4,67			8,26				7,04	4,76	1,52	1,57			5,04		7,08	5,14	
	4				4,59				7,43				2,65		4,8			7,68	
	5	7,8			7,54		4,6		5,87	2,21				1,28	6,98				
	6	3,01			3,85		3,58		7,14	3,24					7,05	11,06			6,18
	7	12,18							7,32	4,63					3,91	6,51	13,1	2,01	8,75
	8						3,87		6,3	4,16					5,27				
	9	14,16	7,19	4,16			9,18				26,7			14,16	13,68	2,96			
	10	2,12			7,57		20,8				2,13				14,8				3,42
	11						3,12		5,41			4,44			8,82			2,62	
	12						3,09		4,31				9,77		9,51			2,27	2,81

III.5.3 Conclusion et perspectives

De l'ADN provenant d'organismes souterrains (genre *Nipharagus*) a bien été amplifié avec succès, mais l'objectif de cette étude n'a pas été atteint, puisque (i) les résultats d'amplification de répliquats fournissent des résultats différents, ce qui montre que la méthode n'est pas répliquable et (ii) aucune séquence correspondant à des mollusques souterrains n'a été obtenue. Cette méthode demande donc à être améliorée, en particulier en augmentant la quantité des prélèvements et en concentrant l'ADN directement sur le terrain à l'aide de filtres. Des projets sont en cours avec SpyGen pour développer ces méthodes de prélèvements et tenter à nouveau de mettre au point une méthode d'inventaire du milieu souterrain efficace.

III.5 QUEL DETERMINISME DE LA DISTRIBUTION DES TAXONS ?

Bien que les résultats précédents suggèrent que les unités taxonomiques sont corrélées aux unités hydrogéologiques, nous avons testé l'influence des variables environnementales sur la distribution des espèces. Un premier test visait à évaluer l'influence des rejets d'une station d'épuration sur la micro-répartition et l'abondance des espèces dans le sous-écoulement. Nous ne sommes pas parvenu à mettre en évidence des différences dans la composition faunistique ni dans l'abondance des espèces collectées en amont et en aval du rejet. Un deuxième test a consisté en une analyse des occurrences des différentes espèces en fonction de la qualité de l'eau (pour des stations sur lesquelles des données étaient disponibles à la fois sur la qualité de l'eau et sur la composition faunistique). Les résultats montrent que les gastéropodes stygobies ont une grande tolérance quant à la qualité de l'eau et ne semblent pas influencés par des eaux de mauvaise qualité. En revanche, nous avons pu montrer que les faunes les plus diversifiées et les plus spécialisées se trouvent dans des aquifères bénéficiant d'un transit rapide des eaux de surface, donc d'un meilleur approvisionnement en matière organique.

ARTICLE 9

Prié, V., Ladouche, B., Bas, Y. & Batiot, C. *soumis*, Faune stygobie et qualité de l'eau – un essai sur la vulnérabilité des écosystèmes souterrains. *Karstologia*

Malacofaune stygobie et qualité de l'eau : quelles exigences écologiques pour les écosystèmes souterrains ?

Soumis à Karstologia, pour un n° spécial sur l'aquifère de la source du Lez

Vincent Prié^{1,2}

Yves Bas²

Christelle Batiot-Guilhe³

Bernard Ladouche⁴

(1) Muséum national d'Histoire naturelle, Département Systématique et Évolution, USM 603/UMR 7138 "Systématique, Adaptation, Évolution", Équipe "Exploration de la Biodiversité", Case Postale 51, 55 Rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France

(2) Biotope, Service Recherche & Développement, BP 58, 22 bd Maréchal Foch, 34140 Mèze, France

(3) HydroSciences Montpellier UMR 5569 (CNRS, UM1, UM2, IRD), Université Montpellier, Place Eugène Bataillon, CC MSE 34095 MONTPELLIER Cedex 5, France

(4) BRGM, – Direction D3E, Eau, Environnement et Ecotechnologies, 1039 rue de Pinville, 34000 Montpellier, France

Introduction

Le système karstique de la source du Lez est considéré comme un *hotspot* mondial de biodiversité pour les organismes stygobies (Culver & Sket 2000 ; Malard *et al.* 1997 ; Sket 1999). On y recense en effet 31 espèces de crustacés, 12 espèces de mollusques, 1 espèce de planaire et 2 espèces d'annélides. Il est également considéré comme l'un des plus menacés (Malard *et al.* 1997), en raison du développement important des activités humaines sur son bassin versant : prélèvements d'eau et effluents domestiques et agricoles pourraient avoir un impact négatif sur tout l'écosystème.

Les précédentes études sur la répartition des mollusques souterrains des systèmes karstiques Nord-Montpelliérains semblent indiquer que leur distribution géographique est liée à l'organisation spatiale des masses d'eau (Girardi 2009b ; Prié 2008 ; Prié & Bichain 2009) ce que semblent confirmer les approches génétiques en cours (Prié, *ined.*). Toutefois, il ne peut être exclu que les mollusques stygobies aient des capacités de dispersion suffisantes pour coloniser les aquifères adjacents mais qu'ils soient en revanche sensibles à la qualité de l'eau. Les masses d'eau des systèmes karstiques Nord-Montpelliérains présentent en effet des caractéristiques hydrochimiques différentes ce qui pourrait également constituer un facteur explicatif de aires de répartition des espèces mollusques stygobies. Si tel était le cas, des modifications environnementales même minimales (pollutions agricoles et/ou urbaines, augmentation de la température des aquifères en raison du changement climatique) pourraient avoir un impact direct sur les populations en place et constituer une menace pour ces espèces à distribution restreinte et qui présentent des enjeux législatifs et de conservation.

Bien que les gastéropodes hydrobioïdes soient souvent considérés comme des bio-indicateurs de la qualité de l'eau (ex. Directive Cadre sur l'Eau ; Bouchet 1990), il n'existe à notre connaissance aucune étude spécifique sur la sensibilité des gastéropodes stygobies à la qualité de l'eau. Nous proposons ici d'explorer les relations entre la présence / absence de différents morphospecies de gastéropodes stygobies au sein de différents karsts du nord-montpelliérain et les variables environnementales : influence de la température de l'eau, de la nature de la roche et de l'aptitude qu'a le karst à restituer l'infiltration, et des variables qui caractérisent les activités humaines.

Matériel et méthodes

Echantillonnage de la faune stygobie et données utilisées

La zone d'étude se focalise sur les karsts du Nord-Montpelliérain, de Nîmes à l'est jusqu'aux environs de Millau au nord-ouest. Dix-sept hydrosystèmes karstiques pour lesquels des données de qualité de l'eau étaient disponibles ont été échantillonnés pour la faune stygobie (Figure 1). Les prélèvements ont été effectués systématiquement sur le lieu d'échantillonnage de la qualité de l'eau, à l'exception de l'Aven du mas Raynal pour lequel les données proviennent de la source de la Sorgue, située à quelques kilomètres à l'aval.

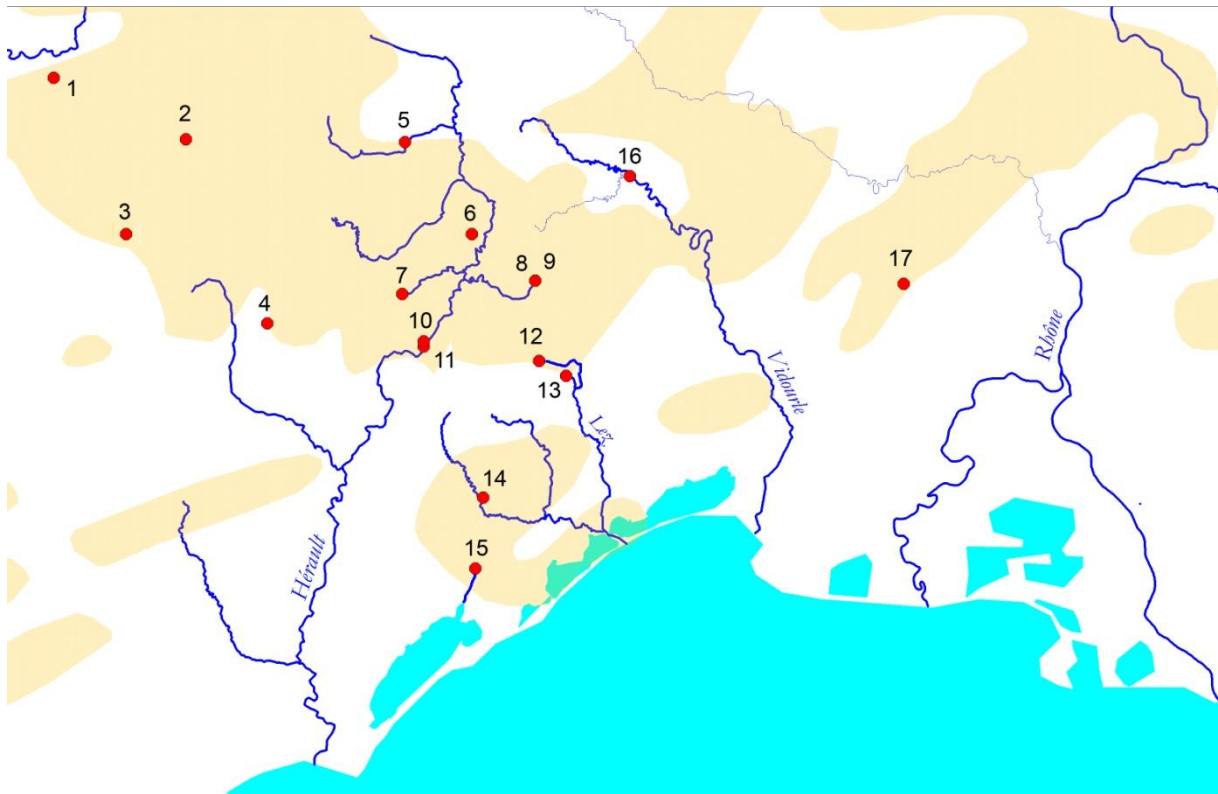


Figure 1 : localisation des systèmes échantillonnés pour le milieu stygobie. 1 : source d'Homède ; 2 : source du Durzon ; 3 : aven du Mas Raynal (réseau de la Sorgue) ; 4 : source de Saint-Etienne-de-Gourgas ; 5 : source d'Isis ; 6 : sources du château de Brissac ; 7 : sources de la Buèges ; 8 : sources du Lamalou ; 9 : aven du Rouet ; 10 : sources des Cent Fonts ; 11 : source des Fontanilles ; 12 : source du Lirou ; 13 : source du Lez ; 14 : puits de l'Aven ; 15 : source de la Vène ; 16 : source de Sauve ; 17 : fontaine de Nîmes.

Dix morphospecies sont intégrés dans les analyses liées à la richesse spécifique, correspondant à des taxons répartis en trois familles de gastéropodes stygobies : les Amnicolidae (*Bythinella navacellensis*, *B. entrepfa*, *Bythinella* sp.), les Hydrobiidae (*Islamia* sp., *Heraultiella exilis*) ; les Moitessieriidae (*Moitessieria rolandiana*, *Moitessieria* sp. 1, *Bythiospeum bourguignati*, *Paladilbia pleurotoma*, *P. conica*). Cette étude se base sur des récoltes de coquilles, aussi le terme de morphospecies est plus approprié que celui d'espèce, puisqu'il existe des espèces cryptiques difficilement différenciables sur la base de l'examen des coquilles. Pour l'analyse des corrélations entre présence / absence des taxons et variables de qualité d'eau, nous sommes limités au genre.

Les méthodes d'échantillonnage incluent le prélèvement direct de coquilles à vue dans les cavités souterraines, le prélèvement de sédiment (également pratiqué en plongée) et la pose de filets dérivants en sources et en cavités (voir Prié, 2008 pour plus de détails sur les méthodes d'échantillonnage et de traitement des lots). L'échantillonnage est constitué par les récoltes effectuées entre 2003 et 2010 sur les karsts du Nord-Montpelliérain (Batiot-Guilhe *et al.* 2012; Olivier, Martin, Bou, & Prié, 2006; Prié, 2005,

2006, 2008, 2009; Prié & Bichain, 2009 ainsi qu'un leg de P. Marmonnier pour la source d'Homède). Les données concernant la faune stygobie de la Fontaine de Nîmes proviennent de Girardi (2009a).

Données hydrochimiques des points d'eau considérés

Les données de qualité des eaux de la source du Lez sont issues de la thèse de Bicalho (2010) et du projet Lez (Batiot-Guilhe et al, 2012). Pour les systèmes karstiques adjacent au Lez, les données géochimiques des sources sont issues d'études antérieures (Aquilina et al. 2002; Batiot, 2002; Ladouche et al. 1999, 2002; Marechal & Ladouche, 2006; Plagnes, 1997; Vaute et al. 1997, Droque, Garrelly, & Ghelfenstein, 1997) ainsi que de la base de données ADES (www.ades.eaufrance.fr, données exportées en aout 2012) (voir **Tableau 1** pour une synthèse).

Variabes considérées et méthodologie d'analyses statistiques

Nous avons testé les corrélations entre la composition des communautés de mollusques stygobies (richesse et présence / absence de chaque genre) et les variables de qualité de l'eau (paramètres physico-chimiques et éléments majeurs). Les taxons retenus pour ces analyses sont les genres uniquement, le niveau spécifique n'apportant que peu d'informations supplémentaires (pour une masse d'eau donnée, il n'y a généralement qu'une seule espèce présente pour chaque genre). Nous avons testé l'influence (i) de la température, qui reflète notamment le gradient latitudinal et altitudinal et donc le rôle de refuge qu'auraient pu jouer les karsts les plus méridionaux lors de périodes froides, (ii) des variables reflétant la nature et de l'intensité des interactions eau-roche : bicarbonates (HCO_3), Calcium (Ca), Magnésium (Mg) et (iii) des variables reflétant l'influence anthropique : Chlorures (Cl), Nitrates (NO_3), Sulfates (SO_4), Sodium (Na) et Potassium (K). Les teneurs en Carbone Organique Total (COT) ont été également intégrées à l'analyse statistique, ce traceur permettant de mettre en évidence et discuter l'importance des phénomènes d'infiltration rapide en période de hautes eaux notamment.

L'échantillonnage étant faible ($n < 20$), nous avons utilisé des tests non paramétriques : le test de Wilcoxon pour comparer, genre par genre, l'influence des variables physico-chimiques sur leur présence ainsi que la corrélation de Spearman pour le nombre de genres présents par sites (richesse). Le seuil de significativité a été fixé à 5%.

Les valeurs de Cl, SO_4 , NO_3 , Mg, Na, K et COT ne présentant pas des distributions normales, elles ont été normalisées par une transformation ($\log(x+1)$) pour la suite des analyses. Les variables explicatives Ca et HCO_3 (produits de la dissolution des carbonates) ainsi que Na, Cl, SO_4 et K (variables traduisant notamment l'influence anthropique) étant corrélées entre elles à plus de 70% ($|r| > 0,7$; cf. **Tableau 2**), seul le Ca d'une part et le Na d'autre part ont été retenues pour les analyses. Les variables explicatives conservées par la suite sont donc T° , pH, Na, HCO_3 , NO_3 , Mg et COT.

Les analyses statistiques ont été réalisées sous le logiciel R (R Development Core Team, 2008).

L'amplitude écologique des différents genres de mollusques stygobies est déduite des valeurs maximales et minimales observées sur les sites où ils sont présents.

Tableau 1 : données physico-chimiques disponibles pour les sites étudiés.

Sites (les n° renvoient à la figure 1)	Formation géologique de la zone noyée	Formation géologique de la zone de recharge	Altitude (m) émergence	Nombre de paramètres chimiques disponibles		
				Total et périodes	T°	COT
1 : source d'Homède	Calcaire dolomitique (Jurassique moyen)		520	251 (1991-1993)	169	25
2 : source du Durzon	Calcaire dolomitique (Jurassique moyen)		540	160 (1993-1997)	149	31
3 : aven du Mas Raynal (Sorgue)	Calcaire (Jurassique sup.)		640	29 (2001-2011)	28	22
4 : source de Saint-Etienne-de-Gourgas			310	3 (1997-2001)	3	3
5 : source d'Isis	Calcaire dolomitique du Cambrien		300	35 (1996-2011)	34	34
6 : sources du château de Brissac	Calcaire (Jurassique sup.)		130	49 (1997-2011)	44	40
7 : sources de la Buèges			160	32 (1997-1999)	55	ND
8 : sources du Lamalou	Marno-Calcaire (Crétacé-Valenginien)		200	35 (1997-2008)	29	4
9 : aven du Rouet			205	23 (2001-2007)	23	21
10 : sources des Cent Fonts	Calcaire dolomitique (Jurassique moyen)	Calcaire Jurassique supérieur	90	69 (1997-2001)	65	14
11 : source des Fontanilles			80	58 (1997-2000)	53	3
12 : source du Lirou	Calcaire (Jurassique sup.)		130	62 (2006-2011)	62	58
13 : source du Lez	Calcaire Crétacé (Berriassien) Calcaire (Jurassique sup.)	Jurassique supérieur Pertes dans le Crétacé (Valanginien)	65	240 (2006-2010)	229	205
14 : puit de l'Aven	Calcaire (Jurassique sup.)		65	14 (2005-2007)	23	11
15 : source de la Vène			40	57 (2005-2007)	4	1
16 : source de Sauve	Calcaire (Jurassique sup.)		90	18 (1996-2001)	17	16
17 : fontaine de Nîmes	Calcaire Crétacé (Hauterivien)		55	21 (1998-2005)	36	27

Tableau 2 : matrice de corrélation des variables physico-chimiques.

	T°	pH	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺
pH	-0,19									
HCO ₃ ⁻	0,55	-0,44								
Cl ⁻	0,77	-0,18	0,54							
NO ₃ ⁻	-0,26	0,22	-0,22	0,03						
SO ₄ ²⁻	0,73	-0,14	0,44	0,88	0,05					
Ca ²⁺	0,72	-0,37	0,77	0,77	-0,14	0,70				
Mg ²⁺	-0,43	0,22	-0,34	-0,35	0,37	-0,38	-0,64			
Na ⁺	0,79	-0,19	0,50	0,98	-0,02	0,90	0,73	-0,36		
K ⁺	0,61	-0,04	0,22	0,77	0,20	0,79	0,47	-0,21	0,81	
COT	0,16	0,05	0,25	0,20	0,34	0,14	0,27	-0,22	0,16	0,04

Résultats

Influence de la température

La température est corrélée à plusieurs variables (Tableau 2). Nous avons choisi de la traiter séparément en considérant qu'elle indiquait d'une part une information biogéographique (latitude et altitude) et d'autre part, qu'elle pouvait témoigner de la participation des eaux de surface lors de la recharge. En effet, de par leur structure, les écosystèmes souterrains présentent des variations thermiques extrêmement faibles ; avec une température égale à la moyenne annuelle de la température extérieure des écosystèmes superficiels adjacents, et qui ne varie en général que de quelques dixièmes de degrés au cours de l'année (Gibert & Deharveng, 2002; Ginet & Decu, 1977; Juberthie & Decu, 1994). Les variations de température de l'eau traduisent donc la participation de différents compartiments au cours de l'année ou plus généralement la pénétration des eaux météoriques en l'absence de contribution d'eau d'origine profonde. Dans le cas de l'aquifère du Lez, une composante profonde contribue à augmenter la température de l'eau à l'étiage (de l'ordre de 10%), et ponctuellement de manière plus importante (jusqu'à 18%) lors des crues de reprise hydrologique (Batiot-Guilhe et al, 2012). La température moyenne des eaux du Lez ne reflète donc pas celle de la zone de recharge par les pluies (la température des eaux du Lez est supérieure à celle du Lirou, qui se trouve dans la même situation géographique mais ne bénéficie pas de l'apport des eaux profondes).

On observe un gradient de biodiversité corrélé au gradient de température de l'eau (Figure 2) : les aquifères les plus riches sont ceux qui présentent les températures les plus élevées.

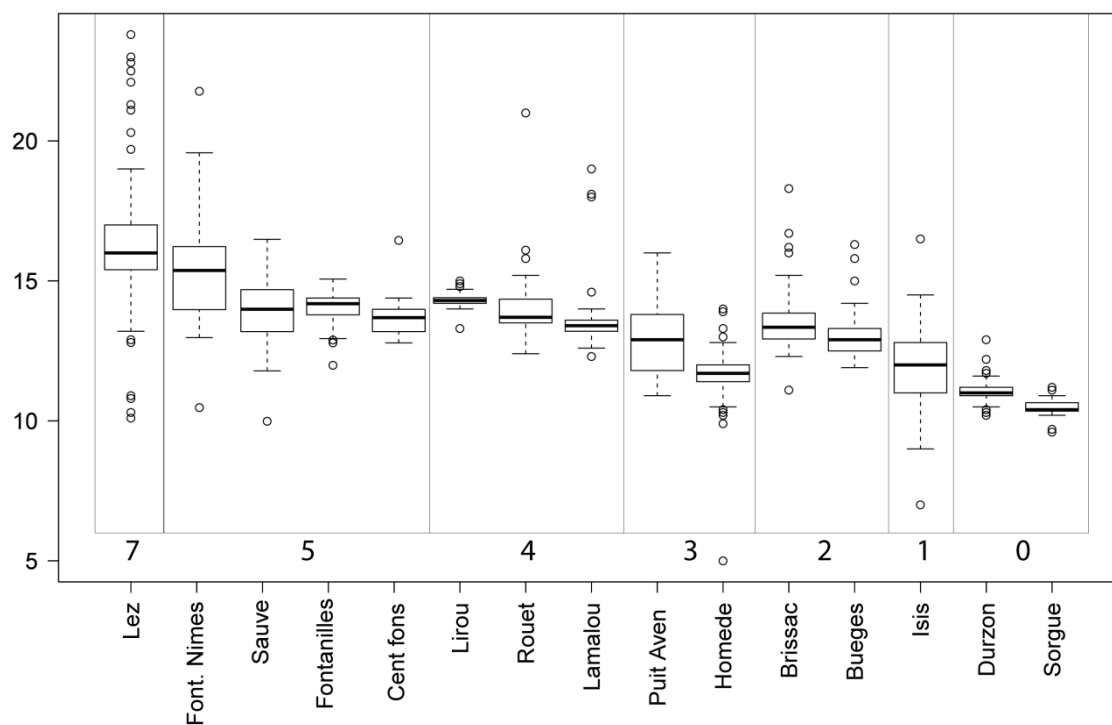


Figure 2 : distribution des valeurs de températures enregistrées au niveau de 15 aquifères karstiques. Les chiffres en abscisse indiquent le nombre d'espèces inventoriées pour chacun des sites ; en ordonnée la température en °C. Les écosystèmes les plus riches présentent les températures d'eau les plus élevées, et, dans une moindre mesure, une plus forte amplitude qui témoigne de l'influence des eaux de la recharge.

Relations entre les variables physico-chimiques et la présence / absence des différents taxons

La corrélation entre la présence des cinq genres de gastéropodes stygobies (le genre *Heraultiella* a été exclu parce qu'il s'agit d'un taxon vivant dans le sous-écoulement et pas à l'intérieur des karsts) et les valeurs de pH, NO₃, Mg, COT, HCO₃ et Na a été testée sur 17 hydrosystèmes (Tableau 3). Sur les systèmes étudiés, qui sont tous développés dans des terrains carbonatés du secondaire, les valeurs de pH ne sont pas significativement corrélées à la présence / absence de gastéropodes stygobies, avec seulement une tendance des genres *Paladilhia* et *Bythiospeum* à être négativement influencés par les valeurs plus faibles. Les variables NO₃, Cl et Na, qui reflètent principalement les influences anthropiques pour les systèmes karstiques étudiés, ne sont pas significativement corrélées non plus avec la présence / absence des différents taxons, avec seulement une tendance pour le genre *Islamia* à préférer les faibles valeurs moyennes et minimales de NO₃. Les concentrations en Mg et HCO₃ (qui sont corrélées au Ca) influencent en revanche très significativement la présence des genres *Paladilhia*, *Bythiospeum* et, dans une moindre mesure, *Moitessieria*, qui montrent une préférence pour les eaux calcaires et une aversion pour les fortes teneurs en magnésium. Enfin, les fortes valeurs maximales en COT influencent négativement le genre *Islamia*, avec des tendances observées également pour les genres *Bythinella* et *Bythiospeum* pour les fortes valeurs minimales.

Amplitude écologique des différents taxons

Ce travail permet pour la première fois de caractériser l'amplitude écologique des espèces de gastéropodes stygobies du sud de la France. Pour certaines espèces pour lesquels les données ne portent que sur un seul système (ex. *P. conica*, *B. entrepha* pour le Lez), l'amplitude écologique n'est connue que par l'amplitude des variables pour cet aquifère. En revanche, pour les espèces plus largement répandues (ex. *M. rolandiana*, *P. pleurotomia*), nous avons pu délimiter l'enveloppe écologique des espèces de manière plus significative à partir des analyses portant sur plusieurs hydrosystèmes (Figure 3).

Tableau 3 : Corrélation des fortes valeurs pour chacune des variables avec la présence / absence des genres *Bythinella*, *Islamia*, *Moitessieria* et *Paladilhia* (tests de Wilcoxon et Mann-Whitney). ++ : corrélation positive forte (p=0,00) ; + corrélation positive faible (p<0,05) ; 0 : relation non significative ; (-) tendance (0,05<p<0,2).

Variables		<i>Bythinella</i>	<i>Islamia</i>	<i>Moitessieria</i>	<i>Paladilhia</i>	<i>Bythiospeum</i>
pH	Max	0	0	0	0	0
	Moy	0	0	0	(-)	(-)
	Min	0	0	0	(-)	(-)
NO ₃	Max	0	0	0	0	0
	Moy	0	(-)	0	0	0
	Min	((-))	(-)	0	0	0
Na	Max	0	(-)	0	0	0
	Moy	0	(-)	0	0	0
	Min	0	(-)	0	0	0
Mg	Max	0	0	0	0	0
	Moy	0	0	((-))	(-)	(-)
	Min	0	0	-	--	--
HCO ₃	Max	0	0	0	++	++
	Moy	0	0	0	++	++
	Min	0	0	0	0	0
COT	Max	0	-	0	0	0
	Moy	0	0	0	0	0
	Min	((-))	(-)	0	0	(-)

H. exilis semble apprécier les eaux chaudes et carbonatées. L'espèce semble globalement tolérante à la plupart des variations de qualité d'eau, avec toutefois une influence négative des concentrations élevées de NO₃, SO₄, Na et Cl. Le genre *Islamia* apparaît également plutôt tolérant à la plupart des composés, ce que reflète sa large répartition en France. Les espèces du genre *Bythinella* semblent tolérer des eaux moins carbonatées et plus froides, ce qui correspond à ce qui est connu en milieu aérien : les espèces de ce genre largement répandues en Europe sont présentes indifféremment sur des terrains carbonatés ou silicatés. Elles sont présentes dans des karsts dolomitiques (ex. Isis, calcaire dolomitique du Cambrien ; Durzon, dolomie du Jurassique) et semblent moins sensibles aux concentrations en NO₃, SO₄, Na et Cl que les autres groupes de stygobies (valeur de -0,5). Les espèces du genre *Moitessieria* seraient plus sensibles aux concentrations en NO₃, SO₄, Na et Cl (valeurs autour de -1) ainsi qu'aux concentrations en Mg. La

présence de *B. bourguignati* et des espèces du genre *Paladibia* est influencée négativement par la concentration en Mg et dans une moindre mesure des NO₃, SO₄, Na et Cl.

Discussion

Température

Les valeurs de température, pH, HCO₃ et Ca sont fortement corrélées (Tableau 2). La corrélation entre HCO₃ et Ca s'explique par le processus de dissolution des terrains carbonatés. La corrélation de la température apparaît généralement pour les systèmes karstiques développés au sein des calcaires jurassiques supérieurs, comme dans le cas des Fontanilles, des Cent Fonts et de la Buèges. Lors des crues, la participation des eaux récemment infiltrées, qui peuvent être plus chaudes que celles de la zone noyée (notamment lors des crues automnales), produit alors une augmentation simultanée des valeurs de température et des teneurs en Ca et HCO₃, alors que le pH diminue (eaux d'infiltration plus acides et plus minéralisées en Ca et HCO₃ que dans la zone noyée, dans le cas de ces systèmes karstiques). Ce phénomène s'accompagne alors logiquement d'une augmentation de l'oxygène dissous.

Les variations de la température de l'eau des aquifères induites par les périodes de recharge sont globalement de faible ampleur (1 à 2 °C tout au plus, à corriger) et s'observent sur de courtes périodes (quelques jours à quelques dizaines de jours au maximum). En absence de contribution d'eau thermique d'origine profonde (cas de la source du Lez), la température de l'eau des aquifères est globalement à corrélée à la température moyenne de l'air des impluviums karstiques ou se produit la recharge par les pluies efficaces. La température de l'eau des aquifères est donc liée à un gradient latitudinal et altitudinal. Les karsts les plus septentrionaux ont des eaux plus froides et sont moins riches en espèces stygobies. Bien que les eaux chaudes puissent être considérées comme favorables à la biodiversité, on peut également penser que les karsts les plus septentrionaux de la zone d'étude ont davantage subi l'influence des glaciations que ceux du sud, qui ont pu constituer des refuges pour la biodiversité pendant les glaciations, ce qui expliquerait qu'ils hébergent aujourd'hui une faune plus diversifiée. En effet, les glaciations représentent l'un des facteurs les plus importants pour expliquer la distribution des espèces hypogées (Ginet, 1971, 1988; Ginet & Juberthie, 1987) et les hotspots de biodiversité européens se situent globalement sur le pourtour méditerranéen (base de données PASCALIS, (Gibert, 2001). Le patron de distribution de la biodiversité des karsts nord-montpelliérains suit effectivement un gradient nord-sud, que traduit la température de l'eau. Il est probable que les karsts les plus méridionaux ont joué un rôle de refuge pendant les périodes froides, expliquant ce patron de distribution, et que les températures élevées ne soient pas en elles-mêmes un facteur explicatif à la diversité des écosystèmes karstiques.

Variables physico-chimiques

Hormis la concentration en HCO₃, les variables étudiées ne sont pas corrélées significativement à la présence ou l'absence des différents morphospecies. Les différents taxons ont une amplitude écologique très large et semblent tolérer les valeurs extrêmes des différentes variables. Les écosystèmes stygobies étant tributaires des eaux météoriques pour l'apport en matière organique (Gibert & Deharveng, 2002), nous avons testé l'influence des eaux de recharge, caractérisées par leur rapport Mg/Ca et la variation des teneurs en COT (Batiot et al. 2003), sur la biodiversité totale de 13 hydrosystèmes (Figure 4). Le rapport Mg/Ca est classiquement utilisé pour caractériser les types d'eau participant aux écoulements des systèmes karstique (eau d'infiltration rapide en provenance de la zone non saturée, eau de la zone saturée). Les rapports Mg/Ca élevés permettent de distinguer les aquifères développés dans les calcaires dolomitiques de ceux développés dans des calcaires pauvres en Mg. Au sein d'un même aquifère de lithologie homogène, l'augmentation du rapport Mg/Ca au cours d'un cycle hydrologique met en évidence la participation d'eaux à plus long temps de séjour. A l'inverse, le COT est un bon marqueur des transferts rapides en provenance de la zone non saturée où se produit l'infiltration et également des zones de pertes d'un cours d'eau dans le cas des systèmes binaires (alimentés de façon diffuse par la pluie et le ruissellement, puis l'infiltration concentrée des eaux de surface). Pour les points d'eau considérés, on distingue trois ensembles : (1) des systèmes très tamponnés avec une faible amplitude du COT, une variation importante du rapport Mg/Ca, compris entre 0,25 et 0,6 (Isis, Durzon, Sorgue). Ces aquifères sont les plus pauvres en faune, avec aucune espèce stygobies ou seulement une espèce de Bythinelle, dont le caractère strictement stygobie demande à être précisé, pour les eaux de la source d'Isis. (2) Des systèmes intermédiaires avec de faibles variations du COT, un rapport Mg/Ca inférieur à 0,2 (Homède, Brissac). La biodiversité présente dans ces aquifères est variable avec deux à trois espèces de gastéropodes stygobies. (3) Des systèmes présentant au moins en période de hautes eaux une forte amplitude en COT, un rapport

Mg/Ca faible et peu variable, inférieur à 0,1 (Lez, Lirou, Puits de l'Aven, Rouet). Ces systèmes sont ceux qui hébergent les faunes les plus riches. Les eaux de Sauve, des Cent Fonts et des Fontanilles présentent un comportement intermédiaire entre (2) et (3), avec des teneurs maximales en COT atteignant occasionnellement de fortes valeurs. Ces aquifères sont également très riches, avec 5 à 6 espèces de gastéropodes stygobies.

Les taxons les plus adaptés au milieu souterrain appartiennent à la famille des Moitessieriidae, qui ne comporte que des espèces exclusivement stygobies. Ces taxons semblent influencés négativement par les fortes teneurs en magnésium, qui caractérisent en particulier les karsts dolomitiques. Ces derniers sont également plus tamponnés et l'influence des eaux de la recharge y est moindre. Les infiltrations sont moins rapides, les temps de séjour plus importants (plusieurs dizaines d'années par exemple pour la source du Durzon (De Montety et al. 2012). Les eaux d'infiltration qui contribuent à la recharge de la zone noyée seraient donc plus pauvres en matière organiques et moins propices à l'établissement d'une faune stygobie dans l'aquifère.

Les écosystèmes les plus riches sont ceux qui bénéficient le plus des eaux météoriques ; on les retrouve dans les systèmes les moins tamponnés et les plus fractionnés, comme le montrent les variables reflétant l'influence des eaux issues de la recharge (température, pH, HCO₃ et Ca). Cette contribution importante des eaux de surfaces, en particulier en période de hautes eaux, peut être mise en évidence par l'augmentation de la concentration en COT. Ces karsts sont aussi dominés par la famille des Moitessieriidae, la plus spécialisée des trois familles de gastéropodes stygobies.

La préférence de la faune souterraine pour des eaux d'origine superficielle, à temps de transit réduit s'explique par l'apport plus important en matière organique. En effet, en l'absence de production primaire, les milieux souterrains sont tributaires des apports extérieurs en matière organique. En milieu aérien, ces apports peuvent être constitués par les espèces troglodites et troglodiles (par exemple le guano des chauves-souris). En milieu aquatique, l'essentiel des apports en matière organique est constitué par les eaux d'infiltration ayant été au contact avec la matière organique du sol et/ou les eaux de surface issues des zones de pertes.

Vulnérabilité des mollusques stygobies aux pressions anthropiques

Les valeurs de Na, Cl, K, SO₄ et NO₃ sont corrélées. Des teneurs élevées en K peuvent être le témoin soit d'une contribution d'eaux d'origine profonde, soit d'eaux impactées par les activités anthropiques. Pour les sources étudiées ici, les concentrations en K ne reflètent que faiblement la contribution des eaux profondes. Dans le cas du Lez, les eaux sont légèrement plus chargées au début des crues, mais les valeurs élevées de NO₃ et K reflètent principalement les activités humaines (agricoles en particulier). Sur le bassin-versant karstique du Lez, les eaux ayant été en contact avec les terrains crétacés (marno-calcaires du Valanginien inférieur) sont naturellement plus riches en SO₄ que les eaux ayant circulé dans les terrains carbonatés du Jurassique. Les activités agricoles (cultures) pour le bassin-versant du Lez sont de plus concentrées là où les sols sont les plus développés, à savoir sur les terrains crétacés. Dans ce contexte, SO₄ et NO₃ peuvent évoluer dans le même sens si les eaux ruissellent sur ces terrains imperméables avant de s'infiltrer dans les calcaires, ou sont en contact avec le toit Valanginien de l'aquifère.

On constate une tolérance importante aux variables issues de l'influence anthropique. Nous n'avons pas pu montrer d'influence négative significative de ces paramètres sur les différents genres de gastéropodes stygobie et les tolérances observées sont très larges. Les différents taxons tolèrent les concentrations maximales observées en coliformes, chlorures et sodium (Figure 3). La Fontaine de Nîmes, réputée pour ses eaux particulièrement polluées (ex. Fabre & Radais, 1986; Marechal & Ladouche, 2006), figure parmi les sites les plus riches avec 5 taxons observés (Girardi, 2009a). La qualité de l'eau semble donc peu importante pour la malacofaune stygobie en comparaison de l'apport en matière organique (qui est important dans le cas de la Fontaine de Nîmes, comme en témoignent les valeurs élevées de COT).

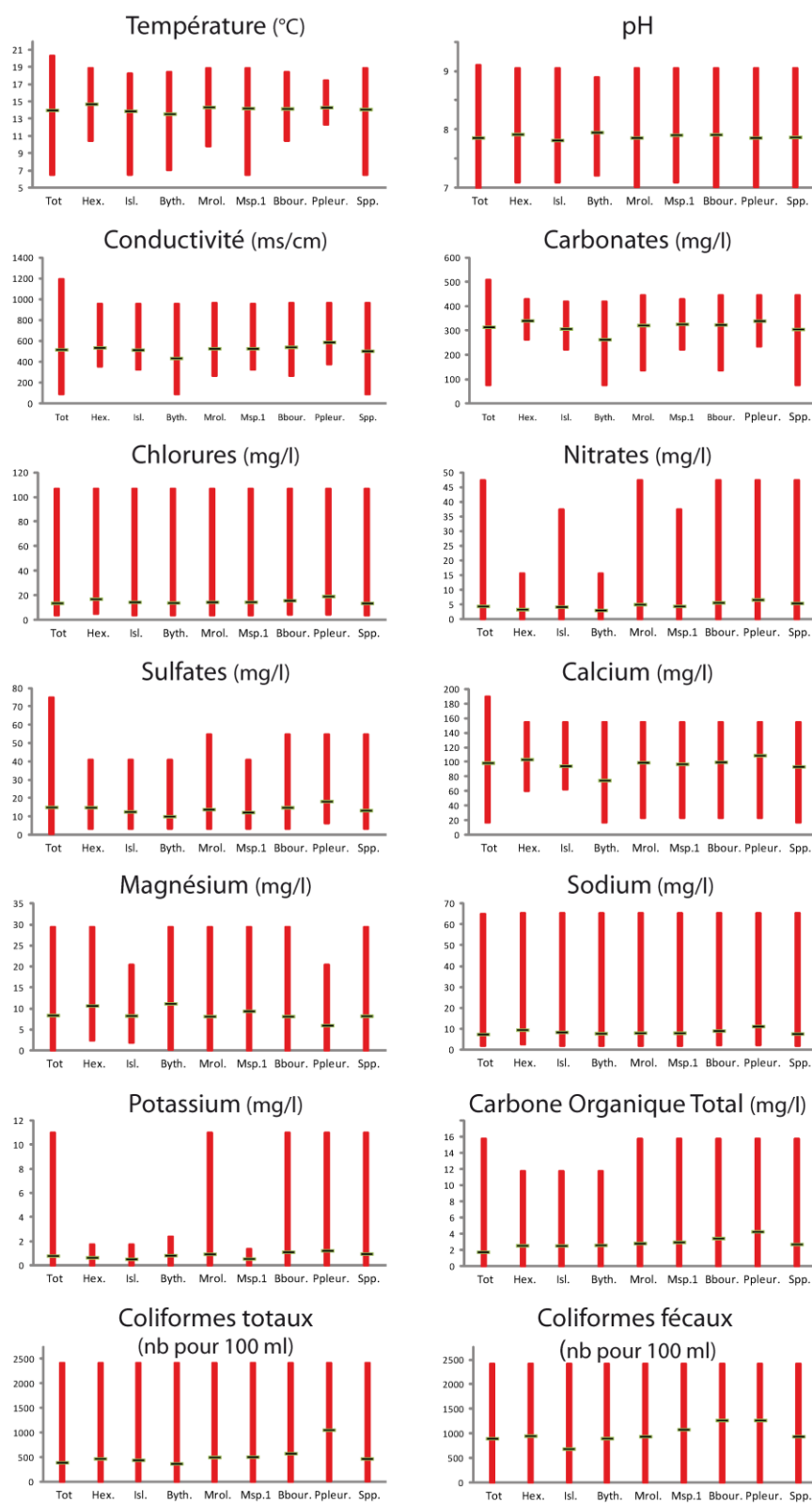


Figure 3: Amplitudes des variables physico-chimiques tolérées par les différents taxons. Tot : amplitude totale de la variable sur l'ensemble du jeu de données ; Hex. : *Heraultiella exilis* ; Isl. : *Islamia* sp. ; Byth. : *Bythinella* spp. ; Mrol. : *Moitessieria rolandiana* ; Msp.1 : *Moitessieria* sp. I ; Bbour. : *Bythiospeum bourguignati* ; Ppleur. : *Paladilhia pleurotoma* ; Spp. : Mollusques stygobies tous taxons confondus.

Barrières géographiques vs conditions environnementales

Les amplitudes écologiques observées pour les gastéropodes stygobies sont globalement très larges, englobant les qualités physico-chimiques d'hydrosystèmes d'où ces espèces sont absentes. Nous n'avons pas mis en évidence de valeurs seuil qui pourraient expliquer l'absence de telle ou telle espèce. Les paramètres étudiés n'ont donc pas d'influence significative sur la répartition des espèces. Dans un travail précédent, basé sur les associations faunistiques en relation avec les entités hydrogéologiques (Prié, 2008), la question de l'influence de la qualité de l'eau sur la répartition des taxons était restée ouverte. D'après les résultats de cette approche basée sur la qualité de l'eau, il est vraisemblable que les barrières géographiques sont le facteur déterminant la distribution des espèces et que les variables physico-chimiques jouent un rôle mineur. Les analyses génétiques en cours sur des populations appartenant à un même morphospecies mais situés dans des hydrosystèmes adjacents (contigus mais non continus) corroborent également l'hypothèse que les barrières géographiques structurent la répartition de la faune souterraine.

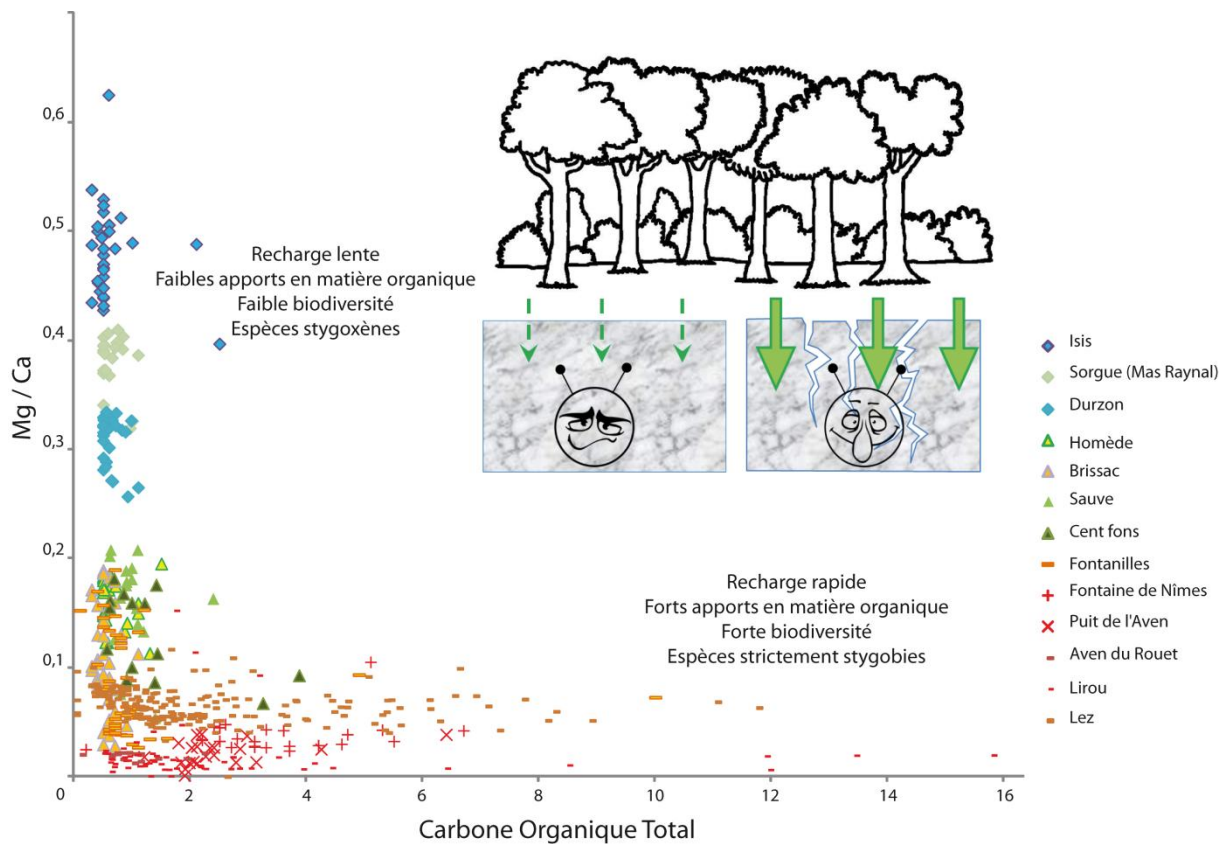


Figure 4 : projection de 13 hydrosystèmes selon les valeurs de COT et de rapport Mg/Ca. On distingue trois grands ensembles de sources, en particulier selon les teneurs en magnésium et les valeurs extrêmes de COT. La richesse spécifique des écosystèmes est liée aux variations importantes du COT et aux faibles teneurs en magnésium.

Conclusion

La comparaison de la richesse spécifique des gastéropodes stygobies avec les paramètres physico-chimiques des eaux ne permet pas de montrer une corrélation nette entre la présence des espèces et les variables prises en compte. Les amplitudes écologiques des différents taxons sont importantes et elles semblent peu ou pas affectées par les variations de qualité d'eau liées aux activités humaines. Le seul facteur qui semble corrélé à la richesse spécifique des écosystèmes karstiques est l'influence des eaux de la recharge : les karsts les plus riches sont ceux pour lesquels l'influence de la recharge est le plus visible et, par voie de conséquence, les apports en matière organique (et en oxygène) les plus importants.

On peut tirer deux conséquences des résultats de ce travail. D'une part, si les conditions environnementales n'influencent pas sur la présence ou l'absence des différents taxons, la distribution des espèces doit être contrainte par les barrières géographiques, comme le suggéraient déjà les approches

basées sur les assemblages faunistiques. D'autre part, quelles mesures conservatoires proposer pour cette foule de taxons endémiques restreints, dont certains présentent déjà des enjeux réglementaires ? Si l'apport en matière organique est bien un facteur déterminant pour la biodiversité des écosystèmes karstiques, le couvert forestier, qui prédominait avant le Néolithique lorsque ces faunes se sont établies, est probablement l'écosystème de surface qui leur procure le plus de matière organique. Au contraire, aujourd'hui la gestion des paysages méditerranéens est essentiellement orientée vers les milieux ouverts. Ces milieux sont maintenus de manière artificielle à l'attention d'espèces charismatiques telles que le Lézard ocellé, la Couleuvre de Montpellier ou l'Aigle de Bonelli. Ces espèces, souvent non-autochtones, présentent des aires de répartition beaucoup plus vastes que la quinzaine d'espèces de gastéropodes stygobies endémiques déjà décrites sur l'aire d'étude présentée ici. La responsabilité régionale en termes de lutte contre l'érosion de la biodiversité est donc moins grande pour les vertébrés de milieux ouverts que pour les écosystèmes souterrains. A l'heure de la sixième extinction (eg. Wake & Vredenburg, 2008)¹⁰, le choix entre une non-gestion et un retour à la naturalité, favorable aux écosystèmes souterrains ; et la gestion active de milieux ouverts artificiels au profit d'espèces charismatiques doit se faire en connaissance de cause.

Remerciements :

Ce travail s'inscrit dans un contrat de projets État-région (CPER) baptisé " Projet de gestion multi-usages de l'hydrosystème karstique du Lez ". Marine Quiers, Hervé Jourde et Jean-Luc Seidel ont participé au CPER-Lez et nous ont fourni des données et/ou des conseils tout au long de ce travail. Pierre Marmonier nous a fourni des lots de mollusques provenant des sources d'Homède et de la Sorgue.

Références

- Aquilina, L., Ladouche, B., Doerfliger, N., Seidel, J. L., Bakalowicz, M., Dupuy, C. & P. Le Strat (2002) Origin, evolution and residence time of saline thermal fluids (Balaruc springs, southern France): implications for fluid transfer across the continental shelf. *Chemical Geology*, 192 : 1-21.
- Batiot-Guilhe, C., Seidel, J. L., Ladouche, B., Prié, V., Cernesson, F., Dorfliger, N., M. Blanc, J.C. Maréchal, V. Léonardi & P.Y. Vion (2012) Projet de gestion multi-usages de l'hydrosystème karstique du Lez - Caractérisation hydrochimique ; qualité chimique, vulnérabilité de l'hydrosystème et de l'écosystème associé. In. BRGM, Montpellier, 292 p.
- Batiot, C. (2002) Étude expérimentale du cycle du carbone en régions karstiques. Apports du carbone organique et du carbone minéral à la connaissance hydrogéologique des systèmes. *Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse*, Avignon, 246 p.
- Batiot C., Emblanch C., Blavoux B. (2003). Carbone Organique Total et magnésium : deux traceurs complémentaires du temps de séjour dans l'aquifère karstique. *C. R. Geoscience*, 335, 205-214.
- Bicalho C. (2010). Hydrochemical characterization of transfers in karst aquifers by natural and anthropogenic tracers. Example of a Mediterranean karst system, the Lez karst aquifer (Southern France). Thèse AgroParisTech, 133 p.
- Bouchet, P. (1990) La malacofaune française: Endémisme, Patrimoine naturel et Protection. *Revue d'Ecologie (la Terre et la Vie)*, 45 : 259-288.
- Culver, D. C. & Sket, B. (2000) Hotspots of Subterranean Biodiversity in Caves and Wells. *Journal of Cave and Karst Studies*, 62 : 11-17.
- De Montety V., Bondu R., Aquilina L., Batiot-Guilhe C., Seidel J.L., Labasque T. (2012). Dissolved gases: new tracers for the characterization of recharge mechanisms and flow dynamic in Karst. GDAT 2012, Groundwater dating workshop, Rennes, October 15-19.
- Fabre, G. & Radais, J. (1986) Karstologie urbaine et rurale appliquée le problème de la Fontaine de Nîmes (Gard). *Karstologia*, 8 : 3-6.
- Gibert, J. (2001) Protocols for the assessment and conservation of aquatic life in the subsurface (PASCALIS): a European project. In: D. C. Culver, L. Deharveng, J. Gibert & I. D. Sasowsky (Eds), *Mapping Subterranean Biodiversity / Cartographie de la biodiversité souterraine, Proceedings of the International Workshop*. Karst Waters Institute, Laboratoire Souterrain du CNRS, Moulis, Ariège, France, pp. 19-21.

¹⁰ La " 6^e extinction ", ou " extinction de l'holocène ", est le nom donné à la crise actuelle de la biodiversité, d'origine anthropique, qui fait suite aux cinq grandes phases d'extinctions qu'a connues la planète à l'échelle des temps géologiques.

- Gibert, J. & Deharveng, L. (2002) Subterranean ecosystems: a truncated functional biodiversity. *BioScience*, 52 : 473-481.
- Ginet, R. (1971) Biogéographie de *Niphargus* et *Caecosphaeroma* (Crustacés troglobies) dans les départements français du Jura et de l'Ain - Origine; influence des glaciations. In: *Proceedings of the 4th International Congress of Speleology*, Neuchâtel, Switzerland.
- Ginet, R. (1988) Le peuplement animal des karsts de France. Deuxième partie : la faune terrestre. *Karstologia*, 11-12 : 61-71.
- Ginet, R. & Decu, V. (1977) *Initiation à l'écologie et à la biologie souterraines*. Paris.
- Ginet, R. & Juberthie, C. (1987) Le peuplement animal des karsts de France. Première partie : la faune aquatique. *Karstologia*, 10 : 43-51.
- Girardi, H. (2009a) Contribution à la connaissance des gastéropodes stygobies de la Fontaine de Nîmes, Gard, France (Situation et fonctionnement) (Mollusca : Caenogastropoda : Moitessieriidae et Hydrobiidae). *Documents Malacologiques, Hors-série n° 3* : 47-49.
- Girardi, H. (2009b) *Paladilbia subconica* et *Paladilbia magnanae*, nouvelles espèces de la grotte des Châtaigniers à Saint-Martin-de-Londres, Hérault, France et autres observations sur les *Moitessieria* (Mollusca : Caenogastropoda : Moitessieriidae). *Documents Malacologiques, Hors-série n° 3* : 109-118.
- Juberthie, C. & Decu, V. (1994) *Encyclopaedia biospeologica I* (Vol. vol. I). Moulis, Bucarest: Société Internationale de Biospéléologie.
- Ladouche, B., Aquilina, L., Petelet, E., Bakalowicz, M. & R., S. (1999) Caractérisation du fonctionnement des systèmes karstiques nord-montpelliérains : Interprétation des données hydrochimiques. . In: BRGM (Ed), *Caractérisation du fonctionnement des systèmes karstiques nord-montpelliérains*. BRGM, 170 p.
- Ladouche, B., Dörfliger, N., Pouget, R., Petit, V., Thiery, D. & Golaz, C. (2002) Caractérisation du fonctionnement des systèmes karstiques nord-montpelliérains. Rapport du programme 1999-2001- Buèges. In: BRGM (Ed). BRGM, 200 p.
- Malard, F., Gibert, J. & Laurent, R. (1997) L'aquifère de la source du Lez : un réservoir d'eau ... et de biodiversité. *Karstologia*, 30 : 49-54.
- Marechal, J.-C. & Ladouche, B. (2006) Fonctionnement hydrogéologique du système karstique de la Fontaine de Nîmes en crue. Rapport final. In. BRGM, Orléans, 111 p.
- Olivier, M.-J., Martin, D., Bou, C. & Prié, V. (2006) Interprétation du suivi hydrobiologique de la faune stygobie, réalisé sur le système karstique des Cent Fonts lors du pompage d'essai. In. Conseil Général de L'Hérault, Montpellier, 40 p.
- Plagnes, V. (1997) Structure et fonctionnement des aquifères karstiques Caractérisation par la géochimie des eaux. *Université de Montpellier II*, Montpellier, 372 p.
- Prié, V. (2005) Répartition de *Heraultiella exilis* (Paladilhe, 1867) (Gastropoda, Caenogastropoda, Rissooidea). *MalaCo*, 1 : 8-9.
- Prié, V. (2006) Moitessieriidae du Nord-Montpelliérain : Morphospecies et micro-répartition. In: *Mémoire de Master II*. Ecole pratique des Hautes Etudes, Montpellier, 44 p.
- Prié, V. (2008) Les escargots souterrains, nouveaux marqueurs des hydrosystèmes karstiques : application aux hydrosystèmes karstiques des massifs nord-montpelliérains. *Karstologia*, 52 : 7-16.
- Prié, V. (2009) Les mollusques de l'Aven du Rouet. *Spelunca*, 113 : 28.
- Prié, V. & Bichain, J.-M. (2009) Phylogenetic relationships and description of a new stygobite species of *Bythinella* (Mollusca, Gastropoda, Caenogastropoda, Amnicolidae) from southern France. *Zoosystema*, 31 : 987-1000.
- Sket, B. (1999) The nature of biodiversity in hypogean waters and how it is endangered. *Biodiversity and Conservation*, 8 : 1319-1338.
- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Vaute, L., Drogue, C., Garrelly, L. & Ghelfenstein, M. (1997) Relations between the structure of storage and the transport of chemical compounds in karstic aquifers. *Journal of Hydrology*, 199 : 221-238.
- Wake, D.B. & V.T. Vredenburg, 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceeding of the National Academy of Science* 105 11466-11473.

RAPPEL DES PRINCIPAUX RESULTATS DE LA PARTIE III

- Un travail préliminaire sur les **associations faunistiques** a montré que les différents aquifères du nord-montpelliérain pouvaient être caractérisés par la faune qu'ils hébergent. Ces **marqueurs** des hydrostèmes étaient ici les genres uniquement, qui sont facilement reconnaissables à partir des coquilles.
- Une **morphométrie fine** des coquilles permet de distinguer chaque population au sein d'un de ces marqueurs, ici *M. rolandiana*. Ces différentes formes sont-elles des écotypes ou des phylotypes ?
- Les apports de la **génétique** permettent de montrer qu'au moins au sein de chaque bassin-versant côtier (Garonne, Hérault, Lez, Vidourle), les populations sont suffisamment divergentes pour qu'elles puissent être élevées au rang d'espèces (**ARTICLE 8**).
- En revanche, les variables environnementales ne semblent pas ou peu influencer la répartition des taxons. Les karsts les plus riches sont les plus fragmentés, soit ceux qui reçoivent le plus de matière organique épigée (**ARTICLE 9**).
- On a donc bien une **signature taxonomique** des unités hydrologiques souterraines. Les unités de gestion de cette faune semblent bien se situer à l'échelle des bassins-versants hydrogéologiques.

Partie IV : Discussion générale



IV.1 SCHEMA THEORIQUE D'INSULARITE CONTINENTALE : LES FLUX DE GENES REFLETENT-ILS LES FLUX D'EAU ?

L'objectif de ce travail est la délimitation des taxons et des unités de gestion, avec en filigrane l'idée de tester le schéma théorique d'insularité continentale.

Hormis chez *U. mancus* (ARTICLE 3), nos résultats ne permettent pas de calquer les différentes unités évolutives observées chez les naïades au réseau hydrologique (ARTICLES 4-6). Les deux clades d'*U. crassus* sont syntopiques dans de nombreux sites du nord de la France. Les deux clades de *P. littoralis* sont également partagés entre la France et l'Espagne, avec des cas de syntopie (bien que pour ce qui concerne le Rhône presque tous spécimens collectés présentent un haplotype particulier). *U. tumidus*, *U. pictorum*, *M. auricularia*, *M. margaritifera* ne présentent aucune structuration génétique en fonction des différents bassins versants, ce qui a justifié l'invalidation des sous-espèces décrites, en considérant, suivant Davis (1994), Bouchet (2002) et Davis (2004) que le niveau sous-spécifique devrait être restreint à des populations isolées géographiquement, ayant évolué indépendamment au point de constituer des lignées évolutives distinctes que l'étude de gènes suffisamment variables devrait permettre de caractériser. Dans la majeure partie des cas étudiés, les espèces ne semblent pas être génétiquement structurées par les barrières géographiques. Au contraire, les résultats de la modélisation d'habitats favorables (ARTICLE 7) semblent indiquer que les aires de répartition des naïades ne sont pas définies par les réseaux hydrographiques, mais suivent des variables environnementales, indépendamment des barrières géographiques. Ces observations sont issues de données de terrain actuelles et pourraient résulter de modifications récentes, telles que des remplacements de faunes liées aux interconnexions d'origine humaine entre les grands bassins-versants. Les capacités de dispersion des naïades seraient alors liées actuellement aux activités humaines. Les données bibliographiques (ex. *U. tumidus*, *M. auricularia* et *U. crassus* à l'amont du bassin-versant du Rhône dans la Saône) indiquent que ces changements dateraient alors au moins du XIX^e siècle.

A l'opposé, le schéma théorique d'insularité continentale semble bien s'appliquer aux unités hydrogéologiques des karsts du nord-montpelliérain. Les unités évolutives observées sont différentes entre les unités hydrogéologiques étudiées. Il y a donc bien une signature taxonomique des hydrosystèmes, comme le pressentaient les premiers travaux basés sur les associations faunistiques. Les trois espèces *M. rolandiana*, *P. pleurotoma* et *B. bourguinati*, dont les aires de répartition présumées étaient relativement larges, comportent chacune des unités évolutives bien distinctes, liées à la biogéographie, qui peuvent même être élevées au rang d'espèce. Les unités de gestion conservatoire de la faune stygobie sont donc bien les hydrosystèmes, à minima les bassins-versants des fleuves côtiers méditerranéens.

IV.2 EVOLUTION DE LA LISTE DE REFERENCE : APPORTS TAXONOMIQUES ET LIMITES

D'après la liste de référence des mollusques continentaux actuelle (Gargominy *et al.* 2011), la France héberge 784 taxons terminaux (695 espèces) de mollusques continentaux, avec un taux d'endémisme de 43%. Ce taux d'endémisme élevé est dû essentiellement aux Hydrobioïdes, qui comptent près de 200 taxons, et pour lesquels l'endémisme atteint 87% (Fig. 39). Le taux d'endémisme est également remarquable chez les Unionidae (63%), mais ne concerne que le niveau sous-spécifique, tel qu'établi par Falkner *et al.* (2002), basé sur les taxons décrits par Haas (1969). Il n'y a en effet aucune espèce de naïade endémique de France.

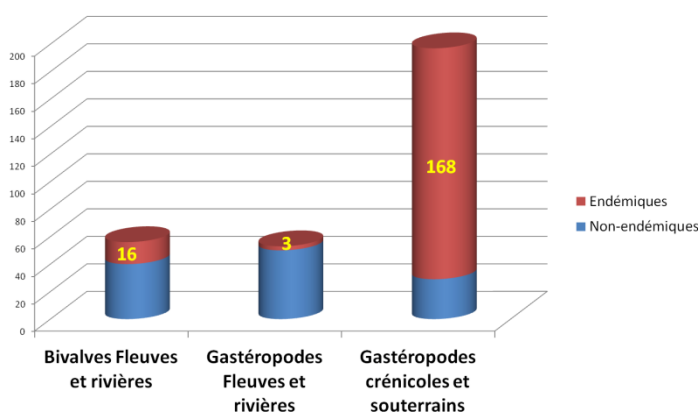


Figure 39 : proportion de taxons terminaux endémiques de France par grands groupes de mollusques aquatiques continentaux (basé sur Falkner *et al.* 2002). Les gastéropodes crénicoles (= vivant dans les sources) et stygobies appartiennent pour l'essentiel au groupe des Hydrobioïdes.

Cet état des lieux a constitué la base de mon travail (ARTICLE 1), ciblé sur les naïades de France et les gastéropodes stygobies du nord-montpelliérain. Quelque soit le concept de l'espèce adopté, les critères sont difficilement observables (voir § I.1.1.4). La morphologie est sujette aux problèmes de convergence et d'écotypes. L'interfécondité est concrètement très difficile à tester. Finalement, la phylogénie moléculaire est le critère le plus accessible pour délimiter les taxons. Reste à bien choisir les gènes étudiés (variabilité idoine pour le niveau spécifique, faisabilité, voir § I.4.5) et à définir un seuil de divergence entre les niveaux inter- et intra-spécifiques (barcoding gap). Ce travail permet donc de réactualiser pour ces deux groupes la liste des taxons valides en France.

Les naïades de France ont fait l'objet de multiples descriptions, notamment par les auteurs de la Nouvelle Ecole, dont l'essentiel a été mis en synonymie par Germain (1931) : Graf & Cumming (2013) recensent 404 synonymes pour l'espèce *Anodonta anatina*. Au contraire, les gastéropodes stygobies ont été relativement peu étudiés par ces auteurs, et la grande majorité des taxons a été décrite au cours des 50 dernières années (voir Fig. 13, § I.3.2.5).

IV.2.1 Combien d'espèces de naïades en Europe ?

La question de la délimitation des espèces européennes à partir des résultats de la phylogénie moléculaire reste ouverte (ARTICLE 6). On observe deux barcoding gaps, l'un à 3%, l'autre à 7%. Il y a aujourd'hui une contradiction entre le traitement de *U. pictorum*, *U. mancus*, *U. elongatulus*, *U. ravoisieri* et *U. delphinus*, qui sont considérés comme des espèces valides, et divergent de moins de 7% ; et celui des clades observés au sein des espèces *U. gibbus*, *U. ravoisieri* et *U. crassus*, qui pourraient alors légitimement être élevés au rang d'espèces. L'utilisation du seuil à 7% (le deuxième barcoding gap de l'ARTICLE 6) conduirait à réduire la liste des espèces présentes en Europe à cinq, hypothèse taxonomique corroborée par les premières approches utilisant l'ADN mitochondrial mâle (voir § II.1.5).

IV.2.2 Les sous-espèces

Valid until synonymized or synonymized until proven valid ?

La liste de référence des naïades de France comporte actuellement dix-sept taxons terminaux au sein du genre *Unio* (Gargominy *et al.* 2011). A l'issue de ce travail, seulement sept peuvent être caractérisés moléculairement, quatre ont été mis en synonymie, six ont été conservés en *incertae sedis* au bénéfice du doute (dont trois qui n'ont pas pu être retrouvés sur leur station type malgré des recherches intensives). Au sein des Margaritiferidae, la seule sous-espèce valide en France semble également devoir être invalidée (ARTICLE 5). Des tendances similaires sont attendues pour les sous-espèces d'Anodontidae (résultats préliminaires non présentés).

La démarche adoptée dans cette thèse consiste à récolter les spécimens présents sur les stations-types des taxons étudiés. Toutefois, il est possible que les bouleversements récents des systèmes hydrologiques, en particulier la dégradation de la qualité de l'eau et les connexions artificielles des différents bassins-versants, aient modifié la composition faunistique de ces stations-types. Il n'est pas sûr que le matériel collecté actuellement corresponde au même pool génétique que le matériel ayant servi à la description des taxons au XIX^e siècle. Par exemple, les spécimens collectés dans le lac du Bourget diffèrent tellement morphologiquement des spécimens conservés en collection qu'il est difficile d'invalider *U. mancus bourgeticus* sur la base de nos résultats (ARTICLE 3). Il est possible qu'une introgression récente, ou que la disparition de la sous-espèce suite à des bouleversements environnementaux aient modifié la faune présente dans le lac du Bourget. Par ailleurs, certains taxons comme *Unio* cf. *platyrhinchoideus* ou *U.* cf. *deshayesii* n'ont pas pu être retrouvés sur leur station-type. Doit-on considérer ces taxons comme des synonymes en s'appuyant sur les résultats obtenus pour les autres sous-espèces ou les considérer comme potentiellement éteints ? Par principe de précaution, ces noms ont été traités comme des *incertae sedis* dans les articles publiés. Toutefois, nous nous sommes basés sur un état de l'art qui ne reposait pas sur des données moléculaires. En toute logique, ce principe de précaution pourrait également être appliqué à tous les noms produits depuis le XVIII^e siècle et qui n'ont pas été réévalués moléculairement.

J'ai utilisé pour caractériser les sous-espèces les marqueurs mitochondriaux traditionnellement utilisés en taxonomie moléculaire pour délimiter les espèces et sous-espèces. Toutefois, l'utilisation de marqueurs plus fins de type microsatellites pourrait permettre d'affiner ces premières approches. En effet, si *M. m. durovensis* et *M. m. brunnea* (ARTICLE 5 ; Machordom *et al.* 2003) ne diffèrent pas des autres populations étudiées au niveau européen, l'utilisation de microsatellites permet de distinguer au sein de cette espèce une structuration génétique importante (ex. Geist & Kuehn 2005 ; Geist *et al.* 2009). Doit-on alors réévaluer le statut des sous-espèces à l'aide de marqueurs plus fins ? Il ne fait pas de doute que les marqueurs utilisés au niveau populationnel permettent de distinguer les populations. Mais doit-on nommer les populations ? Alors que la pertinence du niveau sous-spécifique fait débat chez les taxonomistes (seule l'espèce ayant une réalité biologique selon Mayr 1982), multiplier les unités de conservations en multipliant les noms n'est peut-être pas stratégique (voir § IV.3.3).

IV.2.3 Combien d'espèces de mollusques souterrains dans les karsts de France ?

La rareté du matériel collecté constitue une lacune à l'approche développée ici : la diversité génétique de chaque entité hydrogéologique est probablement sous-estimée et il est possible qu'il y ait en fait un continuum entre des taxons génétiquement très polymorphes. Bien que cette hypothèse ne puisse être écartée, il faut garder à l'esprit l'état de l'art de la taxonomie des gastéropodes stygobies : environ la moitié des taxons décrits actuellement n'ont jamais été collectés vivants et sont décrits uniquement sur une appréciation -souvent subjective- de la morphologie des coquilles (quand il y en a plus d'une !). Jusqu'à présent, seule une espèce, *Bythinella navacellensis*, été décrite avec un argumentaire moléculaire. Le matériel lacunaire fait parti de la culture de la malacologie souterraine et les apports moléculaires, bien qu'incomplets, proposés ici représentent un argument novateur pour la description de nouvelles espèces.

Je me suis limité ici à l'étude de cinq espèces de gastéropodes stygobies de la famille des Moitessieriidae. Pour ce qui concerne *Moitessieria rolandiana*, j'ai pu montrer que chaque population pouvait être différenciée morphométriquement. Pour l'ensemble des taxons, les divergences génétiques observées pour le gène COI sont au-dessus du seuil de divergence interspécifique généralement admis pour distinguer les espèces d'Hydrobioïdes (Hershler *et al.* 2003 ; Liu *et al.* 2003 ; Hurt 2004 ; Prié & Bichain 2009). On peut donc légitimement considérer les lignées évolutives observées comme autant d'espèces distinctes. On aura alors, en suivant les conclusions des analyses moléculaires, trois espèces au lieu d'une au sein de l'aire de répartition de *P. pleurotoma*, trois espèces au sein de l'aire de répartition de *B. bourguignati* et quatre au sein de l'aire de répartition de *M. rolandiana* (Fig. 40). Au contraire de ce qui est observé chez les naïades, la projection de ces résultats sur l'ensemble des karsts du sud de la France suggère que l'alpha-diversité des gastéropodes stygobies est encore largement sous-estimée. En appliquant des outils modernes aux spécimens collectés, sur une aire géographique restreinte échantillonnée de manière intensive, nous avons ouvert une véritable boîte de Pandore. La généralisation de ces résultats à l'ensemble des karsts de France laisse entrevoir une multiplication du nombre de taxons valides dans les années à venir.

Gargominy et al. (2011)

Ce travail

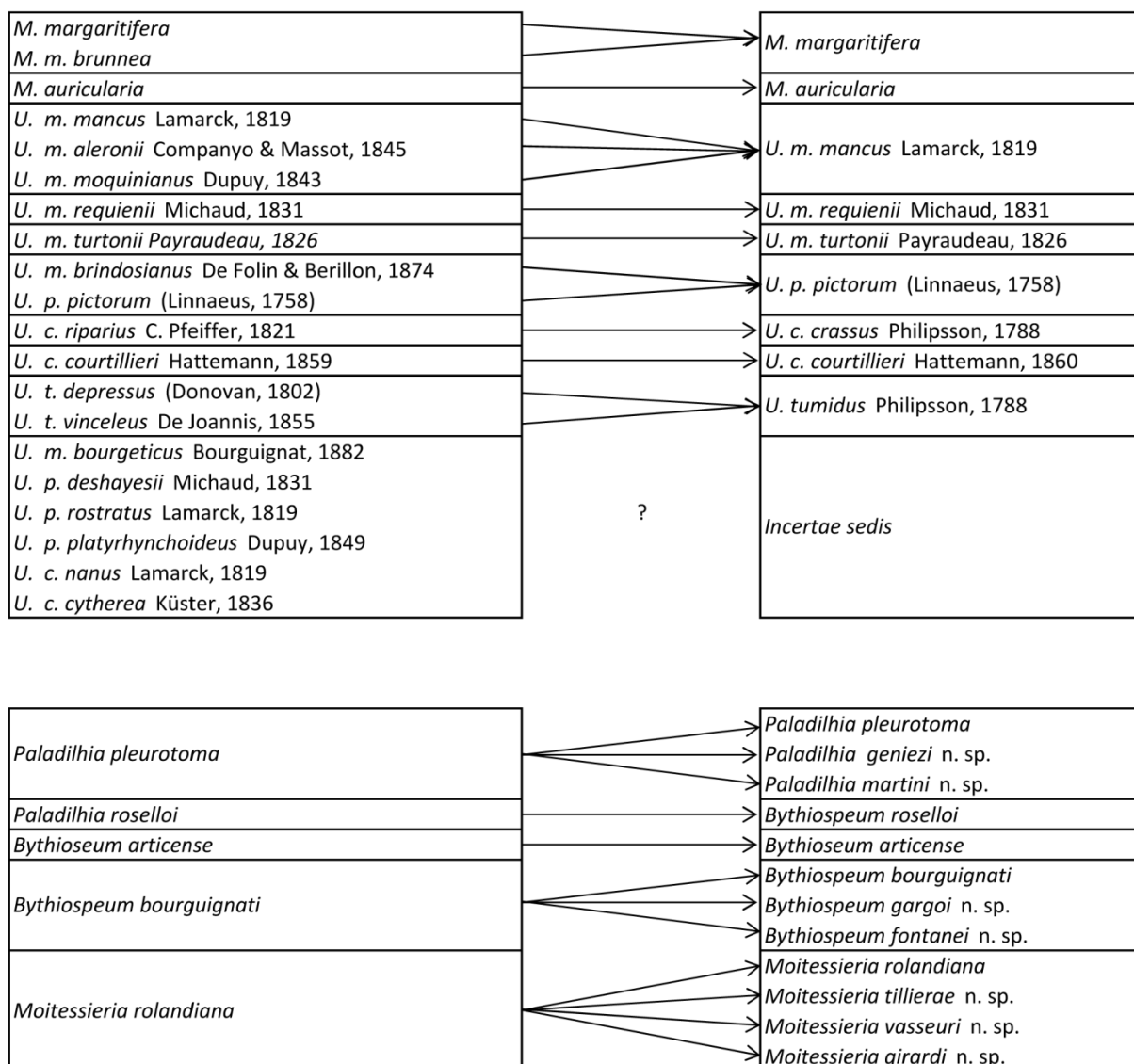


Figure 40 : mes propositions de remaniements taxonomiques pour les bivalves et les gastéropodes stygobies de France. Le nombre de taxons valides doit être réduit pour les naïades au contraire des mollusques stygobies pour lesquels l'alpha-diversité semble être largement sous-estimée. Ces résultats s'inscrivent dans la tendance actuelle de déflation taxonomique pour les bivalves et de descriptions d'espèces nouvelles pour les gastéropodes stygobies (cf. Figs. 11, 13).

IV.3 LES OUTILS D'UNE TAXONOMIE OPERATIONNELLE

IV.3.1 Taxonomie traditionnelle : morphométrie, écotypes et phylotypes

La diversité taxonomique des naïades de France a été surestimée en raison de leur grande variabilité morphologique. Cette variabilité pourrait être liée aux caractéristiques environnementales comme semblent le montrer les exemples de convergence morphologique, les plus frappants étant *U. pictorum* et *U. m. requienii* dans le lac du Bourget ; *U. pictorum* et *U. tumidus* dans l'Aisne ; ou les populations lacustres d'*U. pictorum* et *U. mancus* qui présentent des formes spectaculaires et bien différentes des formes de rivière.

Chez les gastéropodes stygobies, la morphométrie des coquilles permet de distinguer chaque population et ces différences morphologiques semblent corrélées aux divergences génétiques. Toutefois, corrélation n'est pas explication et l'influence des variables environnementales sur la morphologie des coquilles est encore inconnue. Il est donc toujours nécessaire de s'appuyer sur les analyses génétiques pour distinguer avec certitude les différentes lignées évolutives.

IV.3.2 Taxonomie moléculaire opérationnelle

La taxonomie opérationnelle comprend à la fois une approche fondamentale, la délimitation des unités taxonomiques présentes, et une approche appliquée : comment les reconnaître sur le terrain ?

Nous avons notamment cherché dans les différents articles à tester les critères biologiques de délimitation des unités évolutives et des espèces. Il aurait idéalement fallu avoir deux marqueurs moléculaires indépendants, dans la majorité des cas nous n'avons pas pu les obtenir. Nous avons donc pris en compte d'autres critères, morphologiques ou biogéographiques, pour étayer les conclusions obtenues à partir des analyses génétiques. La recherche et l'étude de marqueurs indépendants est une des principales perspectives pour développer ce travail.

Une fois les hypothèses d'espèces proposées, il nous faut fournir des outils pour l'expertise taxonomique. Le choix de sous-traiter les extractions et les amplifications à des sociétés privées est économiquement viable, mais il implique une confiance totale dans le professionnalisme des sous-traitants. La qualité du travail des sous-traitants choisis s'est révélée inégale, et les résultats obtenus semblent corrélés aux tarifs des prestations. La DUI (voir § II.1.5) est un obstacle à l'application du barcoding basé sur le COI pour les espèces du genre *Unio*, en particulier pour *U. crassus* et *U. pictorum* pour lesquelles l'ADN mitochondrial mâle a été souvent amplifié. Dans une optique de taxonomie opérationnelle, le choix du 16S semble s'imposer en raison de son succès à l'amplification, de sa résolution suffisante pour discriminer les taxons étudiés et du grand nombre de séquences de référence disponibles. A l'issue de ce travail, les marqueurs nucléaires se révèlent inappropriés pour déterminer les espèces : le 28S n'est pas assez résolutif et les ITS sont difficiles à amplifier et à aligner. L'ADN mitochondrial mâle n'a pour l'heure pas été assez étudié pour être utilisé de manière opérationnelle.

Concernant les gastéropodes stygobies, c'est aussi le gène 16S qui a eu le meilleur succès à l'amplification, mais toutes les unités évolutives n'ont pas pu être caractérisées pour ce gène. Compte-tenu de la pauvreté du matériel ayant permis de réaliser les analyses génétiques, et parce que les unités de gestion doivent être délimitées pour que les taxons soient pris en compte, je propose de délimiter provisoirement les unités évolutives par la géographie, en faisant l'hypothèse que les limites des bassins-versants de fleuves constituent des barrières infranchissables pour les eaux donc pour les flux de gènes. Mais il est possible que la structuration soit également importante au sein même de ces bassins-versants : on observe une divergence génétique entre les *Moitessieria* de la Vis (aquifères du Larzac méridional, Fig. 41A) et ceux du la source du Cabrier, à l'aval (aquifère de la Séranne et du Causse de la Selle, Fig. 41B). Il est possible qu'il existe également une structuration génétique au sein même des bassins-versants de fleuves méditerranéens.

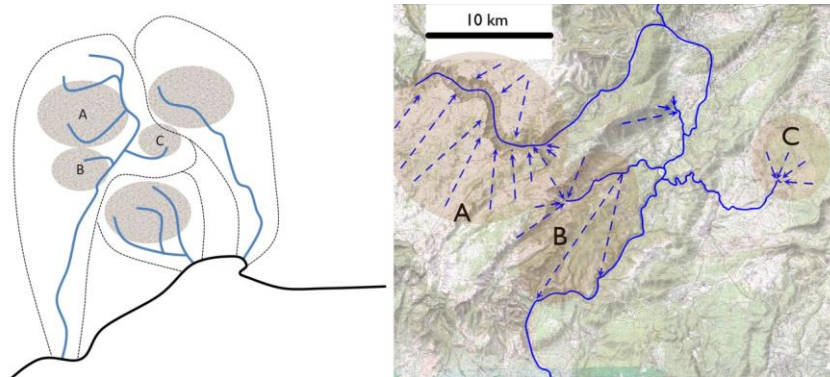


Figure 41 : schéma théorique et réalité de terrain. A gauche, schématisation de trois bassins-versants (lignes pointillées noires en figurent les limites) de fleuves, avec leurs massifs karstiques (ellipses). Si ces unités hydrologiques sont exclusives les unes des autres, elles ne sont pas nécessairement cohésives : au sein du bassin-versant de l'Hérault, les massifs karstiques A, B et C sont potentiellement isolés les uns des autres. A droite, la réalité hydrogéologique (en pointillé les écoulements souterrains, en trait plein les écoulements aériens). Le plateau du Larzac (A) est bien isolé hydrogéologiquement de l'ensemble Seranne-Buèges-Causse de la Selle (B). En effet, les *Moitessieria* récoltés en A divergent de ceux collectés en B. Aucun spécimen vivant n'a été collecté sur le causse de l'Hortus (C), mais ce dernier est encore plus isolé que les deux précédents, ce qui laisse présager de divergences encore plus grandes.

IV.3.3 Vers des listes de référence opérationnelles : s'affranchir du fardeau taxonomique

IV.3.3.1 Des noms qu'on ne pourra pas réévaluer

L'échantillonnage est par définition non-exhaustif. Les modifications hydrologiques ont pu mettre en connexion des faunes précédemment isolées (introgression, introduction, compétition). Les modifications environnementales ont pu être à l'origine de la disparition récente de lignées évolutives. Que faire alors des entités qui étaient couvertes par des noms sans qu'on sache si ils englobent des individus, des populations ou des écotypes et qui ne seront pour certains jamais réévalués ? Doit-on les conserver au bénéfice du doute ou les synonymiser en considérant que l'état de l'art de la taxonomie doit reposer sur des données de terrain ?

Alors que les synonymisations successives (ex. Germain 1931 ; Haas 1969) de la plupart des noms produits par la Nouvelle Ecole sont unanimement saluées et largement acceptées, malgré le peu d'arguments présentés par leurs auteurs, le principe de précaution actuel (ex. Bouchet 2006 ; Gargominy *et al.* 2011) conduit à reproduire dans les listes de références successives les noms correspondant à des *incertae sedis*. Ce **fardeau taxonomique**, cette masse de noms conservés par principe de précaution et qui, bien souvent, ne pourront jamais faire l'objet d'une synonymisation indubitable en raison de la pauvreté du matériel type, biaise l'estimation de l'alpha-diversité en faisant implicitement l'hypothèse que les *incertae sedis* sont des taxons valides en attente d'être réévalués. Nos réévaluations moléculaires montrent le contraire : la majorité des taxons considérés comme valides actuellement (sur la base de Gargominy *et al.* 2011) semble devoir être synonymisés.

Deux exemples : parmi les naïades, *Pseudanodonta complanata ligerica* est considérée comme la sous-espèce du bassin de la Seine. Je n'ai séquencé que deux spécimens provenant du bassin-versant de la Seine, ils ne présentent pas de particularités génétiques en comparaison des autres *Pseudanodonta complanata* d'Europe. Cet échantillonnage suffit-il à invalider la sous-espèce *P. c. ligerica* du bassin de la Seine ? L'argument selon lequel les spécimens échantillonnés pourraient être issus d'une introduction récente, ou d'introgression pourra toujours s'appliquer, même si l'échantillonnage est plus important, puisqu'on ne pourra jamais prouver l'absence d'un taxon. *Unio* cf. *platyrhynchoides* et *Unio* cf. *deshayesii* semblent éteints de leur station-type. Si tel est bien le cas, ces taxons ne pourront pas être réévalués moléculairement, à moins de travailler sur le matériel historique, ce qui semble très difficile pour l'heure. Doit-on les conserver dans la liste des espèces valides ? Doit-on les considérer comme éteintes ? Si oui, pourquoi ne pas appliquer la même démarche à tous les noms établis au XIX^e siècle et qui ont été mis en synonymie sans argumentaire par Germain et Haas ?

Chez les gastéropodes stygobies, certains cas sont encore plus difficiles à traiter : *Moitessieria cocheti* n'est décrite que d'une seule coquille qui ne diffère pas significativement des juvéniles de *M. locardi*, une espèce morphologiquement très variable, et présente sur la station-type de *M. cocheti* (Bertrand 2004). *Palaeospeum nanum*, également décrit d'une seule coquille, est vraisemblablement un juvénile de *P. bessoni rebenacquensis*, de l'avis même d'un des auteurs de la description (Bertrand op. cit.). *Istriana falkneri* a été décrite d'une seule coquille cassée trouvée dans une laisse de crue de la Drôme. Cette coquille ressemble fortement aux formes scalaires d'espèces du genre *Avenonia*, qui se rencontrent fréquemment. Comment récolter un matériel similaire pour réévaluer son statut taxonomique ? Toutes ces espèces nominales sont très difficilement invalidables tant le matériel type, comme les descriptions originales, sont lacunaires.

Ces taxons douteux posent plusieurs problèmes. D'une part ils biaisent l'estimation de l'alpha-diversité, voir du taux d'extinction, si l'on considère comme des espèces éteintes chacun des taxons qu'on ne parvient pas à retrouver aujourd'hui. D'autre part, ils cumulent tous les critères pour se trouver au sommet de la pyramide lors des processus de hiérarchisation des enjeux. Lors de l'établissement de mesures de conservation, les processus de hiérarchisation des enjeux se basent sur des degrés de rareté. Les espèces douteuses cumulent généralement tous les critères de rareté : micro-endémiques, connues d'un très petit nombre d'individus, jamais revue depuis la date de leur description... au détriment d'espèces biologiques bien réelles et réellement menacées. Alors que les enjeux de conservation de la nature sont grandissants, que le législateur met en jeu des sommes colossales à la charge des aménageurs et que, paradoxalement, les crédits dédiés à la conservation s'épuisent, il semble important d'offrir aux gestionnaires une meilleure lisibilité des enjeux réels au travers de listes de références opérationnelles.

La réfutabilité est l'un des pré-requis de la démarche scientifique (ex. Popper 1934). Une liste de référence opérationnelle pourrait s'affranchir du fardeau taxonomique en s'appuyant uniquement sur les données de terrain actuelles, et en ne conservant que les espèces décrites de manière réfutable, c'est à dire a minima sur l'examen d'une série de spécimens, avec une localité-type revisitabile, et si possible du matériel qui puisse être étudié avec des moyens modernes.

IV.3.3.2 La synonymisation constitue-t-elle une perte de puissance en termes de conservation ?

Un des arguments pour le maintien de noms dans les listes de référence est le poids qu'ils auraient en termes de conservation "It is extremely difficult to convince engineers or politicians of the value and need for protection of a special, even unique, unnamed form, but from the moment that a name can be provided there exists a recognizable unit which can be referred to" (Falkner *et al.* 2001). Cette attitude louable est fortement critiquée par Davis (2004), pour qui la taxonomie et la politique ne devraient pas se mélanger (voir aussi § I.2.2.2). De mon point de vue, la multiplication des noms n'apporte rien en termes de conservation. A titre d'exemple, les sept sous-espèces d'*Unio mancus* considérées comme valides pendant 10 ans (Falkner *et al.* 2002 à nos jours), dont certaines présentaient des enjeux de conservation importants (par exemple l'aire de répartition restreinte pour *U. m. brindosianus* ou *U. m. bourgeticus* ; la raréfaction importante voir la possible extinction d'*Unio cf. platyrhinchoideus*) n'ont pas apporté de moyens pour leur conservation. Au contraire, l'essentiel des moyens alloués à la conservation des bivalves d'eau douce est reporté par des espèces à aire de répartition large comme *M. margaritifera* ou *U. crassus* (Prié 2013). Les sous-espèces reconnues au sein de ces deux taxons n'ont jamais été invoquées pour la mise en œuvre de programmes de conservation spécifiques en France. Les vrais rouages de la conservation ne sont pas là (voir § I.2.2). La simplification taxonomique que je propose pour les naïades de France n'aura donc pas un impact négatif sur les politiques de conservation. Elle peut en revanche simplifier les textes et les rendre plus opérationnels.

IV.4 CONSERVATION

IV.4.1 Structuration génétique et abondance : qu'y avait-il alors qu'il n'y a plus ?

Si il est possible que certains taxons (ex. *U. cf. platyrhinchoideus*) aient disparu et que d'autres (ex. *U. cf. bourgeticus*) aient été victimes d'introgression génétique, il est en revanche certain que les naïades de France ont décliné de manière drastique, autant en termes de répartition qu'en termes d'abondance, au cours du siècle dernier.

L'espèce ayant subi le plus fort déclin est sans conteste *M. auricularia*, avec une réduction de 90% de son aire de répartition (mesuré par la contraction du polygone convexe englobant toutes les données, soit l'EEO). Suivent deux espèces non ciblées par les politiques de conservation, *Potomida littoralis* et *Unio tumidus*, dont les aires de répartition se sont contractées de 70% en France. Dans l'indifférence générale, ces trois espèces ont donc subi un déclin plus important que la très charismatique *M. margaritifera* (contraction de 53%) (ARTICLE 7).

Au-delà du déclin spatial des naïades, il est difficile de se faire aujourd'hui une idée du déclin en termes d'abondance. Les textes et documents anciens (Fig. 42) nous fournissent des témoignages, non quantifiés mais vertigineux : "Dans la région que la Charente arrose, (...) le massacre était considérable. Dans ce fleuve, les *Unio* étaient jadis nombreux à ce point que c'était par pleins bateaux que l'on emportait leurs coquilles pour les livrer aux fabricants de boutons de nacre." (Bonnemère 1901).

L'abondance de bivalves dans les rivières avait de toute évidence un impact fonctionnel sur l'écosystème (Aldridge *et al.* 2007) : leur rôle de filtration devait influencer sur la clarté de l'eau (Mc Ivor 2004), et de là sur la pénétration de la lumière, donc sur l'abondance de macrophytes, favorables à la reproduction des poissons (Strayer *et al.* 1999). En effet, les riverains de la Vienne ont pu témoigner de la modification de la clarté des eaux de la Vienne suite à la colonisation par la Corbicule, espèce introduite, qui a remplacé les espèces autochtones et restauré leur rôle fonctionnel de filtreur. La Renoncule aquatique *Ranunculus aquatilis* Linnaeus, 1753 dont les herbiers constituent un habitat d'intérêt communautaire (n°3260-3) est réapparue à la suite de la colonisation de cette espèce invasive, mais qui peut être considérée comme un proxy des espèces autochtones aujourd'hui en déclin.

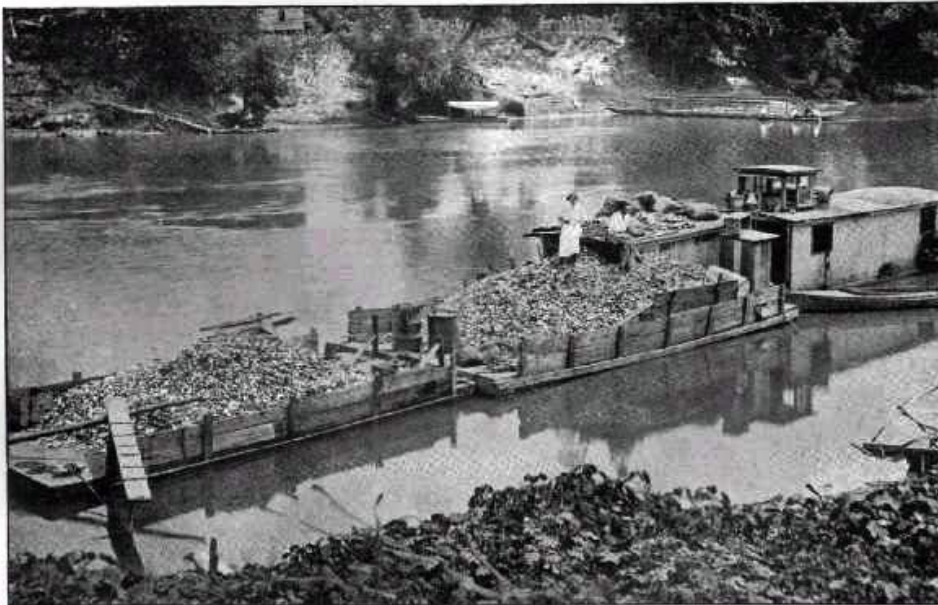


FIG. 2.—Barges loaded with shells and two shellers' house-boats, in Arkansas. (See p. 59.)

Figure 42 : Des barges remplies de bivalves, en Amérique du nord, un des témoignages d'une abondance passée (in Strayer *et al.* 2004).

IV.4.2 Nouvelles espèces et anciennes lois, biodiversité contre " sociodiversité "

Les gastéropodes stygobies sont généralement micro-endémiques de systèmes karstiques localisés. La fragmentation du milieu souterrain explique ces patterns de distribution. Les analyses morphométriques et moléculaires menées sur les gastéropodes stygobies du nord-montpelliérain montrent que cette fragmentation est encore plus importante qu'estimé précédemment, avec des unités taxonomiques distinctes pour chaque bassin-versant de fleuve.

Quelles sont les conséquences de cette multiplication de noms nouveaux en termes de conservation ?

Dans l'immédiat, la scission d'une espèce protégée en plusieurs espèces pose le problème du statut de protection de ces nouvelles espèces. Si la réponse à cette question semble évidente pour le naturaliste, qui considèrera par principe de bon sens que les nouvelles espèces héritent du statut de protection de l'espèce initiale, il n'est pas sûr que cet argument soit juridiquement recevable. Dans les circonstances socio-économiques actuelles, où la réglementation sur la protection de la nature peut mettre en œuvre des sommes d'argent colossales (voir ENCART I), le vide juridique concernant cette question mériterait qu'on y regarde de plus près.

Chacun de ces taxons peut légitimement être considéré comme vulnérable ou menacé, d'une part parce qu'il s'agit d'espèces présentant déjà des enjeux de conservation et d'autre part parce que leurs aires de répartition sont encore plus restreintes. Dans un monde idéal, on s'attendrait donc à ce que chacun des taxons décrit intègre la liste des espèces protégées, auquel il faudrait ajouter les taxons qui n'ont pas été pris en compte jusqu'à présent (voir **Tableau 3**). Toutefois, cette multiplication des noms sur les listes risque de les rendre inopérantes voir inapplicables. Une solution plus opérationnelle pourrait être de considérer la protection du milieu plutôt que celle des espèces. Le milieu souterrain étant considéré comme un habitat d'intérêt communautaire (Habitat 8310-4 pour les eaux souterraines), les gestionnaires peuvent donc s'appuyer sur la protection de ce milieu pour préserver la biodiversité importante qu'il héberge, quelque soit le lieu et le degré de connaissance de la faune présente.

Les paysages du nord-montpelliérain font l'objet d'une attention particulière des gestionnaires de la nature en raison d'enjeux de conservation importants : ils cumulent la présence d'espèce menacées et très charismatiques telles que l'Aigle de Bonelli *Aquila fasciata* Vieillot, 1822 ; le Lézard ocellé *Timon lepidus* (Daudin, 1802), la Couleuvre de Montpellier *Malpolon monspessulanus* Linnaeus, 1758 ; ou encore des orchidées. La plupart de ces espèces visées par les mesures de conservation sont des espèces de milieux ouverts. La gestion du paysage favorise donc le pastoralisme, ce qui est socialement bénéfique et bien perçu par la population. Toutefois, ces espèces phare ne sont pas des micro-endémiques régionaux. Elles sont même bien souvent en limite d'aire, et la question de leur indigénat dans le sud de la France reste ouverte. Les mesures de conservation favorisent donc des espèces pour lesquelles la responsabilité de la France est limitée, ou tout au moins partagée.

A l'opposé, les gastéropodes stygobies sont micro-endémiques et la responsabilité nationale et même parfois régionale est totale pour ces espèces. Nous avons pu montrer (**ARTICLE 9**) que la richesse des karsts était corrélée à l'apport en matière organique. L'apport en matière organique d'une pâture à mouton rasée au point de laisser la roche apparente est inférieur à celui d'un couvert forestier, avec une production de feuilles et d'humus. La gestion conservatoire en faveur des milieux ouverts favorise donc des espèces à large répartition, dont la présence est liée aux activités humaines depuis le néolithique, au détriment d'une faune spécifique qui s'est mise en place il y a bien longtemps, alors que les paysages méditerranéens étaient recouverts de forêt. Ces choix conservatoires engagent la responsabilité de leurs auteurs à l'heure du bilan de la sixième extinction, qui sera mesuré en nombre d'espèces éteintes, et pas en déclin des aires de répartition d'une faune charismatique.

Bibliographie

- Adams, L.E., 1905. A plover with *Anodonta cygnea* attached to its foot. *Journal of Conchology* 11: 175.
- Agapow, P.M., O.R.P. Bininda-Emonds, K.A. Crandall, J.L. Gittleman, G.M. Mace, J.C. Marshall & A. Purvis, 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. *The quarterly review of biology* 79: 161-179.
- Agrell, I., 1948. The shell morphology of some Swedish unionids as affected by ecological conditions. *Arkiv för Zoologi* 41A: 1-30.
- Aldridge, D.C., T.M. Fayle & N. Jackson, 2007. Freshwater mussel abundance predicts biodiversity in UK lowland rivers. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 17: 554-564.
- Araujo, R. & M.A. Ramos, 2001. Action plans for *Margaritifera auricularia* and *Margaritifera margaritifera* in Europe. Council of Europe Publishing, Strasbourg.
- Avias, J., 1995. Gestion active de l'exurgence karstique de la source du Lez (Hérault, France) 1957-1994. *Hydrogéologie* 1: 113-127.
- Bahl, A., M. Pfenninger, H. Bamberger, M. Frye & B. Streit, 1996. Survival of snails in fragmented landscapes. In J. Settele, C.R. Margules, P. Poschlod & K. Henle (ed.), *Species survival in fragmented landscapes.*, Kluwer, Dordrecht, Netherlands: 329-343.
- Bank, R.A., G. Falkner & T.V. Proschwitz, 2007. CLECOM-Project - A revised checklist of the non-marine Mollusca of Britain and Ireland. *Heldia* 5: 41-72.
- Barberousse, A. & S. Samadi, 2010. Species from Darwin onward. *Integrative Zoology* 5: 187-197.
- Bauer, G. & K. Wächtler, 2000. Environmental relationships of Naiads: threats, impact on the ecosystem, indicator function. In G. Bauer & K. Wächtler (eds.), *Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionoida.* Springer, Berlin: 311-315.
- Beaumont, A.R., G. Turner, A.R. Wood & D.O.F. Skibinski, 2004. Hybridisations between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* and performance of pure species and hybrid veliger larvae at different temperatures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 302: 177-188.
- Belovsky, G.E., 1987. Extinction models and mammalian persistence. In M.E. Soulé (ed.), *Viable Populations for Conservation.* Cambridge University Press Cambridge New York: 35-58.
- Beaumont, A.R., G. Turner, A.R. Wood & D.O.F. Skibinski, 2004. Hybridisations between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* and performance of pure species and hybrid veliger larvae at different temperatures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 302: 177-188.
- Bertram, C., 1969. Man pressure. In P. Shepard & M. Mackinley (ed.), *The subversive Science: essays towards an ecology of Man,* Houghton Mifflin, Boston: 210-215.
- Bertrand, A., 2004. Atlas préliminaire de répartition géographique des mollusques souterrains de France (Mollusca : Rissoidea : Caenogastropoda). *Documents malacologiques* Hors série n°2: 82.
- Bichain, J.M., C. Boudsocq & V. Prié, 2004. Les mollusques souterrains du réseau karstique de Padirac (Lot, France) et micro-répartition de *Bythinella padiraci* Locard, 1903 (Mollusca, caenogastropoda, Rissooidea). *Karstologia* 43: 9-18.
- Bichain, J.-M., P. Gaubert, S. Samadi & M.-C. Boisselier-Dubayle, 2007. A gleam in the dark: Phylogenetic species delimitation in the confusing spring-snail genus *Bythinella* Moquin-Tandon, 1856 (Gastropoda: Rissooidea: Amnicolidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 927-941.
- Bichain, J.M., M.C. Boisselier-Dubayle, P. Bouchet & S. Samadi, 2007. Species delimitation in the genus *Bythinella* (Mollusca: Caenogastropoda: Rissooidea): a first attempt combining molecular and morphometrical data. *Malacologia* 49: 293-311.
- Bioret, F., H. Couderc, M. Couderc, M. Godeau & D. Malengreau, 1990. Le Narcisse de Glénan - *Narcissus triandrus* L. subsp. *capax* (Salisb.) D.A. Webb. Étude de sa valeur taxonomique. 22. In: Ministère de l'Environnement, Direction de la Nature et des paysages (ed.) *Rapport ENV-DNP,* Ministère de l'environnement, Paris.
- Blandin, P., 2009. De la protection de la nature au pilotage de la biodiversité. Quae, Versailles.
- Bodon, M. & F. Giusti, 1991. The genus *Moitessiera* in the Island of Sardinia and in Italy new data on the systematics of *Moitessiera* and *Paladilhia* (Prosobranchia: Hydrobiidae) (Studies on the Sardinian and Corsican malacofauna, IX). *Malacologia* 33: 1-30.
- Bodon, M., G. Manganelli & F. Giusti, 2002. *Heraultiella* new name for *Heraultia* Bodon M., Manganelli G., Giusti F., 2001 (Gastropoda : Hydrobiidae). *Journal of Conchology* 37: 681.

- Boeters, H.D., R. Monod & J.C. Vala, 1977. Westeuropäische Hydrobiidae, 6. Hydrobia (Semisalsa) Radoman (Prosobranchia). *Archiv Fur Molluskenkunde* 108: 45-50.
- Boeters, H.D., 1979. Species concept of prosobranch freshwater molluscs in Western Europe I. *Malacologia* 18: 57-60.
- Boeters, H.D., 1988. Westeuropäische Moitessieriidae, 2) und Westeuropäische Hydrobiidae, 7). Moitessieriidae und Hydrobiidae in Spanien und Portugal. *Archiv fur Molluskenkunde* 118: 181-261.
- Boeters, H.D., 1992. On the invasion of subterranean waters by small prosobranchs in central Europe. abstract, World Congress of Malacology.
- Boeters, H.D., Gittenberger, E., 1990. Once more on the Moitessieriidae (Gastropoda, Prosobranchia), with the description of *Claemia brooki* gen. et spec. nov. *Basteria* 54: 123-129.
- Bogan, A.E., 2008. Global diversity of freshwater mussels (Mollusc, Bivalvia) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 139-147.
- Bole, J. & F. Velkovrh, 1986. Mollusca from continental subterranean aquatic habitats. In L. Botosaneanu (ed.), *Stygofauna Mundi*, Leiden: 177-208.
- Bonnemère, L., 1901. Les mollusques des eaux douces de France et leurs perles. Publié par Institut international de bibliographie scientifique, 1901, Paris.
- Bou, C. & R. Rouch, 1967. Un nouveau champ de recherche sur la faune aquatique souterraine. *Comptes Rendus de l'académie des sciences de Paris* 265: 369 - 370.
- Bouchet, P., 1990. La malacofaune française: Endémisme, Patrimoine naturel et Protection. *Revue d'Ecologie (la Terre et la Vie)* 45: 259-288.
- Bouchet, P. & J.-P. Rocroi, 2010. Nomenclator of Bivalve Families; with a classification of bivalve families by R. Bieler, J. G. Carter & E. V. Coan. *Malacologia* 52: 1-184.
- Bouchet, P., 2002. Mollusques terrestres et aquatiques de France: un nouveau référentiel taxonomique, un nouveau départ, de nouvelles perspectives. In G. Falkner, T.E.J. Ripken & M. Falkner (eds.), *Mollusques continentaux de France. Liste de référence annotée et bibliographie*. MNHN, Paris: 5-20.
- Bouchet, P., 2006. Valid until synonymized, or invalid until proven valid? A response to Davis (2004) on species check-lists. *Malacologia* 48: 311-319.
- Bousquet 2010. Analyse morphométrique des coquilles de *Moitessieria rolandiana* dans l'Hérault. Biotope. 53 pp.
- Boyer, S.L., A.A. Howe, N.W. Juergens & M.C. Hove, 2011. A DNA-barcoding approach to identifying juvenile freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae) recovered from naturally infested fishes. *Journal of North American Benthological Society* 30: 182-194.
- Breton, S., H.D. Beaupré, D.T. Stewart, H. Piontkivska, M. Karmakar, A.E. Bogan, P.U. Blier & W.R. Hoeh, 2009. Comparative Mitochondrial Genomics of Freshwater Mussels (Bivalvia: Unionoida) with Doubly Uniparental Inheritance of mtDNA: Gender-Specific Open Reading Frames and Putative Origins of Replication. *Genetics* 183: 1575-1589.
- Buhay, J. E., 2009. "COI-LIKE" sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology* 29: 96-110.
- Caro, T.M., 2003. Umbrella species: critique and lessons from East Africa. *Animal Conservation* 6: 171-181.
- Carson, R., 1962. *Silent Spring*. Houghton Mifflin, Boston.
- Castellin, M., 2010. Lien entre endémisme et développement larvaire en milieu marin. Le cas des gastéropodes des monts sous-marins de la Zone Economique Exclusive de Nouvelle Calédonie. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. 284pp.
- Chesney, H.C.G., P.G. Oliver & G.M. Davis, 1993. *Margaritifera durrovensis* Phillips, 1928: taxonomic status, ecology and conservation. *Journal of Conchology* 34: 267-299.
- Cochet, G., 2004. La Moule perlière et les nayades de France. Histoire d'une sauvegarde. Christian Bouchardy, Nohanent.
- Conway, M., M. Rayment, A. White, S. Berman, A. Turbé, B. Chenot, Tanja Münchmeyer, A.D. Toni, L. Johansson, A. Mitsios & S. Mudgal, 2013. Exploring potential demand for and supply of habitat banking in the EU and appropriate design elements for a habitat banking scheme. In: E. Commission (ed.), ICF GHK, Bio Intelligence Service, London.
- Culver, D. & B. Sket, 2000. Hotspots of subterranean biodiversity in caves and wells. *Journal of Cave and Karst Studies* 62: 11-17.
- Cuttelod, A., M. Seddon & E. Neubert, 2011. European Red List of Non-marine Molluscs. 97. In: IUCN (ed.), Publications Office of the European Union, Luxembourg.

- Darwin, C., 1878. Transplantation of shells. *Nature* 18: 120-121.
- Darwin, C., 1882. On the dispersal of freshwater bivalves. *Nature* 25: 529-530.
- Daufresne, T., 2013. Megafauna as a nutrient pump. *Nature Geosciences* 2013, 6: 679–680.
- Davis, G.M., 2004. Species check-lists: death or revival of the Nouvelle Ecole? *Malacologia* 46: 227-231.
- Davis, J.I. & K.C. Nixon, 1992. Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology* 41: 421-435.
- Dayrat, B., 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407-415.
- Déjean, T., A. Valentini, A. Duparc, S. Pellier-Cuit, F. Pompanon, P. Taberlet & C. Miaud, 2011. Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoS ONE* 6: e23398.
- De Queiroz, K., 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation - a conceptual unification and terminological recommendations. In D.J. Howard & S.H. Berlocher (ed.), *Endless forms. Species and speciation*. Oxford University Press, Oxford: 57-75.
- De Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56: 879.
- Devos, N., O. Raspé, A.-L. Jacquemart & D. Tyteca, 2006. On the monophyly of *Dactylorhiza* Necker ex Nevski (Orchidaceae): is *Coeloglossum viride* (L.) Hartman a *Dactylorhiza*? *Botanical Journal of the Linnean Society* 152: 261-269.
- Donlan, C.J., J. Berger, C.E. Bock, J.H. Bock, D.A. Burney, J.A. Estes, D. Foreman, P.S. Martin, G.W. Roemer, F.A. Smith, M.E. Soule & H.W. Greene, 2006. Pleistocene Rewilding: An Optimistic Agenda for Twenty-First Century Conservation. *The American Naturalist* 168: 660–681.
- Dörfliger, N., 2008. Une gestion active des systèmes karstiques, pourquoi? Exemples et perspectives. 29-38. In: U.D.O. Ecole Polytechnique (ed.) *Colloque Hydrogéologie et karst au travers des travaux de Michel Lepiller*, Orleans.
- Doucet-Beaupré, H., S. Breton, E.G. Chapman, P.U. Blier, A.E. Bogan, D.T. Stewart & W.R. Hoeh, 2010. Mitochondrial phylogenomics of the Bivalvia (Mollusca): searching for the origin and mitogenomic correlates of doubly uniparental inheritance of mtDNA. *BMC Evolutionary Biology* 10: 50.
- Dubois, A., 1998. Lists of European species of amphibians and reptiles: will we soon be reaching "stability"? *Amphibia-Reptilia* 19: 1-28.
- Duval, M.F., J.L. Noyer, X. Perrier, G. Coppens D'eeckenbrugge & P. Hamon, 2001. Molecular diversity in pineapple assessed by RFLP markers. *Theoretical and applied genetics* 102: 83-90.
- Engel, H., 1990. Untersuchungen zur Autökologie von *Unio crassus* (Philipsson) in Nord-deutschland, Universität Hannover, Hannover.
- Estes, J.A., M.T. Tinker, T.M. Williams & D.F. Doak, 1998. Killer Whale Predation on Sea Otters Linking Oceanic and Nearshore Ecosystems. *Science* 282: 473-476.
- Faideau, F., 1938. Les perles d'eau douce de Saintonge. *Annales de la Société des Sciences Naturelles de la Charente Inférieure III*: 37-52.
- Falkner, G., A. Bank & T v. Proschwitz, 2001. Clecom-Project. Check-list of the non- marine molluscan species-group taxa of the States of Northern, Atlantic and Central Europe (CLECOM I). *Heldia*, 4: 1-76.
- Falkner, G., T.E.J. Ripken & M. Falkner, 2002. Mollusques continentaux de la France. Liste de référence annotée et bibliographie. *Patrimoine Naturels* 52: 1-350.
- Ferguson, J.W.H., 2002. On the use of genetic divergence for identifying species. *Biological Journal of the Linnean Society* 75: 509-516.
- Ferreira, D., 2005. Biodiversité aquatique souterraine de France : Base de données, patrons de distribution et implications en termes de conservation, Université Claude Bernard - Lyon, Lyon. 234.
- Ficetola, G.F., C. Miaud, F. Pompanon & P. Taberlet, 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4: 423-425.
- Fisher, C. & D.O.F. Skibinski, 1990. Sex-biased mitochondrial DNA heteroplasmy in the marine mussel *Mytilus*. *Proceedings of the Royal Society of London* 242: 149 - 156.
- Fontaine, B., Bichain, J.-M., Cucherat, X., Gargominy, O. & Prié, V. 2010. Les noms français des mollusques continentaux de France : Processus d'établissement d'une liste de référence. *Revue d'écologie (Terre Vie)*, 65(4): 1-25.
- Fontaine, B., O. Gargominy & E. Neubert, 2007. Priority sites for conservation of land snails in Gabon: testing the umbrella species concept. *Diversity and Distributions* 13: 725-734.
- Foreman, D., 2004. *Rewilding North America*. Island Press, Washington - Covelo - London.
- Gargominy, O., V. Prié, J.-M. Bichain, X. Cucherat & B. Fontaine, 2011. Liste de référence annotée des mollusques continentaux de France. *MalaCo* 7: 307-382.

- Garrido-Ramos, M.A., D.T. Stewart, B.W. Sutherland & E. Zouros, 1998. The distribution of male-transmitted and female-transmitted mitochondrial DNA types in somatic tissues of blue mussels: Implications for the operation of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome* 41: 818-824.
- Gaston, K.J., 2000. Global patterns in biodiversity. *Nature* 405: 220-227.
- Gay, L., G. Neubauer, M. Zagalska-Neubauer, C. Debain, J.-M. Pons, P. David & P.-A. Crochet, 2007. Molecular and morphological patterns of introgression between two large white-headed gull species in a zone of recent secondary contact. *Molecular Ecology* 16: 3215-3227.
- Geist, J. & R. Kuehn, 2005. Genetic diversity and differentiation of central European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) populations: implications for conservation and management. *Molecular Ecology* 14: 425-439.
- Geist, J. 2005. Conservation Genetics and Ecology of European Freshwater Pearl Mussels (*Margaritifera margaritifera* L.). Salzburg, Universität München: 132.
- Geist, J. 2010. Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of Conservation Genetics and Ecology. *Hydrobiologia*, 644: 69-88.
- Geist, J., H. Söderberg, A. Karlsberg & R. Kuehn, 2009. Drainage-independent genetic structure and high genetic diversity of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) in northern Europe. *Conservation Genetics* 11: 1339-1350.
- Geist, J., O. Rottmann, W. Schroder & R. Kuhn, 2003. Development of microsatellite markers for the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. (Bivalvia : Unionoidea). *Molecular Ecology Notes* 3: 444-446.
- Germain, L., 1931. Mollusques terrestres et fluviatiles (seconde partie). Paul Lechevalier, Paris.
- Gibert, J., 2001. Protocols for the assessment and conservation of aquatic life in the subsurface (PASCALIS): a European project. 19-21. In: D.C. Culver, L. Deharveng, J. Gibert & I.D. Sasowsky (ed.) Mapping Subterranean Biodiversity / Cartographie de la biodiversité souterraine, Proceedings of the International Workshop, Karst Waters Institute, Laboratoire Souterrain du CNRS, Moulis, Ariège, France.
- Gibert, J. & L. Deharveng, 2002. Subterranean ecosystems: a truncated functional biodiversity. *BioScience* 52: 473-481.
- Gilpin, M.E. & M.E. Soulé, 1986. Minimum viable populations: Processes of species extinction. In M.E. Soulé (ed.), Conservation Biology: the Science of Scarcity and Diversity. Sinauer Associates Inc. Sunderland Massachusetts: 19-34.
- Girardi, H., 2003. *Moitessieria calloti*, espèce nouvelle, redescription de *Moitessieria rhodani* (Bourguignat, 1893) et autres moitessieries des départements du Gard et de l'Ardèche (Gastropoda, Moitessieridae). *Documents malacologiques* 4: 59-66.
- Girardi, H., 2009a. *Heleobia (Semisalsa) stagnorum* (Gmelin, 1791), dans les étangs gardois (Mollusca : Caenogastropoda : Hydrobiida : Cochliopinae). *Documents Malacologiques* Hors-Série n°3: 147-152.
- Girardi, H., 2009b. *Paladilbia subconica* et *Paladilbia magnanae*, nouvelles espèces de la grotte des Châtaigniers à Saint-Martin-de-Londres, Hérault, France et autres observations sur les *Moitessieria* (Mollusca : Caenogastropoda : Moitessieridae). *Documents Malacologiques* Hors-série n° 3: 109-118.
- Girardi, H., J.M. Bichain & M. Wienin, 2002. Description de deux nouvelles espèces de bythinelles (Mollusca, Caenogastropoda, Hydrobiidae) des exurgences de Castelbouc et de Montbrun (France, Lozère). *Documents Malacologiques* 3: 43-54.
- Giusti, F. & E. Pezzoli, 1982. Notes on the small hydrobioidea in Italian subterranean waters: catalogue, biogeography and some systematic problems. *Malacologia* 22: 463-468.
- Gofas, S., 2010. CLEAMAM - Check List of European Marine Mollusca. <http://www.somali.asso.fr/cleamam/> consulté en 2013
- Graf, D.L. & K.S. Cummings. 2013. The Freshwater Mussels (Unionoidea) of the World (and other less consequential bivalves), updated 8 August 2013. MUSSEL Project Web Site, <http://www.mussel-project.net/>. consulté en 2013
- Grayson, D.K., 1984. Nineteenth century explanations of Pleistocene extinctions: a review and an analysis. In P.S. Martin & R.G. Klein (ed.), Quaternary extinctions: a prehistoric revolution. University of Arizona press, Tucson.
- Grimaldi, D. & M. S. Engel, 2005. *Evolution of the insects* New York.
- Gyllensten, U., D. Wharton, A. Josefsson & A.C. Wilson, 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352: 255-257.

- Haas, F., 1969. Superfamilia Unionacea. De Gruyter, Berlin.
- Hardin, G., 1968. The tragedy of the Commons. *Science* 162: 1243-1248.
- Harris, D. & E. Froufe, 2005. Taxonomic inflation: species concept or historical geopolitical bias? *Trends in Ecology and Evolution* 20: 6.
- Harris, J. D., 2003. Can you bank on GenBank? - *Trends in ecology & evolution* 18: 317-319.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. Dewaard, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 313-321.
- Hebert, P.D.N., S. Ratnasingham & J.R. Dewaard, 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B* (Suppl.) : Biology Letters e-publishing.
- Hershler, R., H.-P. Liu & F.G. Thompson, 2003. Phylogenetic relationships of North American nymphophiline gastropods based on mitochondrial DNA sequences. *Zoologica Scripta* 32: 357-366.
- Hessling, T.V., 1859. Die Perlmuscheln und ihre Perlen (Naturwissenschaftlich und geschichtlich mit Berücksichtigung der Perlgewässer Baerns). Leipzig.
- Hlaváč, J.C., 2002. Molluscan fauna of the Javorický Karst (Czech republic, central Moravia). *Malacological Newsletter* 20: 93-105.
- Hochwald, S., 1997. Populationsökologie der Bach muschel (*Unio crassus*). Bayreuther Forum Ökologie 50.
- Hochwald, S., 2001. Plasticity of life-history traits in *Unio crassus*. In G. Bauer & K. Wächtler (ed.), Ecology and evolution of the Freshwater Mussels Unionoida. Springer, Berlin, Heidelberg: 127-141.
- Hoeh, W.R., K.H. Blakley & W.M. Brown, 1991. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science* 251: 1488-1498.
- Holder, E., 2008. Vie et mœurs de la moule. *Penn ar Bed* 203: 2-17.
- Humbert, G., 1995. Principaux textes internationaux relatifs à la protection de la nature. Ministère de l'Environnement (Direction de la Nature et des Paysages) Museum National d'Histoire Naturelle (Délégation Permanente à l'Environnement).
- Hurt, C.R., 2004. Genetic divergence, population structure and historical demography of rare springsnails (Pyrgulopsis) in the lower Colorado River basin. *Molecular Ecology* 13: 1173-1187.
- Isaac, N.J.B., J. Mallet & G.M. Mace, 2004. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 464-469.
- IUCN, 2001. IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- IUCN, 2012. The IUCN Red List of Threatened Species. IUCN. <http://www.iucnredlist.org/> consulté en 2013.
- IUCN, 2010. Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria. Version 8.1. In: S.A.P. Subcommittee (ed.), IUCN. <http://jr.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>
- Johnson, L.E. & J.T. Carlton, 1996. Post-establishment spread in large-scale invasions: dispersal mechanisms of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecology* 77: 1686-1690.
- Joordens, J., F. D'errico, F. Wesselingh, S. Munro, J.D. Vos, J. Wallinga, C. Ankjærgaard, J. Wijbrans, K. Kuiper, H.J. Mùcher, H. Coqueugniot, V. Prié, M. Panuel, V.D. Haas, W. Lustenhouwer, I. Joosten, J. Reijmer & W. Roebroeks., *submitted*. *Homo erectus* used shells for tool production and engraving, at Trinil, Java. *Nature*.
- Källersjö, M., T. Von Proschwitz, S. Lundberg, P. Eldenäs & C. Erséus, 2005. Evaluation of ITS rDNA as a complement to mitochondrial gene sequences for phylogenetic studies of freshwater mussels: an example using Unionidae from north-western Europe. *Zoologica Scripta* 34: 415-424.
- Karl, S. & B. Bowen, 1999. Evolutionary significant units versus geopolitical taxonomy: molecular systematics of an endangered sea turtle (genus *Chelonia*). *Conservation Biology* 13: 990-999.
- Kerr, J.T., 1997. Species richness, endemism, and the choice of areas for conservation. *Conservation Biology* 11: 1094-1100.
- Kew, H.W., 1893. The Dispersal of Shells, London.
- Killeen, I.J., D. Aldridge & G. Oliver, 2004. Freshwater bivalves of Britain and Ireland. FSC/AIDGAP, London.
- Knapp, S., E. Ludhadha & A. Paton, 2005. Taxonomic inflation, species concepts and global species lists. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 7.
- Kondo, R., Y. Satta, E.T. Matsuura, H. Ishiwa, N. Takahata & S.I. Chigusa, 1990. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics* 126: 657-663.

- Lacépède, 1804. Histoire Naturelle des Cétacés [par M. de Buffon]. Plassan, Paris.
- Lansbury, I., 1955. Some notes on invertebrates other than Insecta found attached to water bugs (Hemipt.-Heteroptera). *Entomologist* 88: 139–140.
- Latour, B., 1999. Politiques de la nature. Comment faire entrer les sciences en démocratie ? La découverte, Paris, 382 pp.
- Lavoux, T. & A. Féménias, 2011. Compétences et professionnalisation des bureaux d'études au regard de la qualité des études d'impact (évaluations environnementales). *In*: Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement (ed.), Conseil général de l'Environnement et du Développement durable, Paris. 70 pp.
- Lefébure, T., C.J. Douady, M. Gouy, P. Trontelj, J. Briolay & J. Gibert, 2006a. Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology* 15: 1797-1806.
- Lefébure, T., C.J. Douady, M. Gouy & J. Gibert, 2006b. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 435-447.
- Lefébure, T., C.J. Douady, M. Gouy, P. Trontelj, J. Briolay & J. Gibert, 2006c. Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology* 15: 1797-1806.
- Lefèvre, G. & W.C. Curtis, 1910. Reproduction and parasitism in the Unionidae. *Journal of Experimental Zoology* 9: 79-115.
- Leroy, M., 2004. Gestion stratégique des écosystèmes dans un contexte d'aide internationale. Engagements environnementaux et dispositifs de gestion dans la vallée du fleuve Sénégal. ENGREF, Paris. 613
- Lima, P., M. Lopes-Lima, U. Kovitvadhi, S. Kovitvadhi, C. Owen & J. Machado, 2012. A review on the "in vitro" culture of freshwater mussels (Unionoida). *Hydrobiologia* 691: 21-33.
- Liu, H.P., R. Hershler & K. Clift, 2003. Mitochondrial DNA sequences reveal extensive cryptic diversity within a western American springsnail. *Molecular Ecology* 12: 2771-2782.
- Locard, A., 1893. Conchyliologie française. Les Coquilles des eaux douces et saumâtres de France. Description des familles, genres et espèces. J.-B. Baillière & fils, Paris.
- Lydeard, C., R. H. Cowie, W. F. Ponder, A.E. Bogan, P. Bouchet, S.A. Clark, K.S. Cummings, T.J. Frest, O. Gargominy, D.G. Herbert, R. Hershler, K.E. Perez, B. Roth, M.B. Seddon, E.E. Strong & F.G. Thompson, 2004. The global decline of nonmarine Mollusks. *BioScience* 54: 321-330.
- Lyell, C., 1832. Principles of geology: being an inquiry how far the former changes of the earth's surface are referable to causes now in operation. John Murray, London.
- Machordom, A., R. Araujo, D. Erpenbeck & M.A. Ramos, 2003. Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionoidea). *Biological Journal of the Linnean Society* 78: 235-252.
- Magoulas, A. & E. Zouros, 1993. Restriction-site heteroplasmy in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) indicates incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* 10: 319-325.
- Malard, F., J. Gibert & R. Laurent, 1997a. L'aquifère de la source du Lez : un réservoir d'eau ... et de biodiversité. *Karstologia* 30: 49-54.
- Malard, F., J.-L. Reygrobellet, R. Laurent & J. Mathieu, 1997b. Developments in sampling the fauna of deep water-table aquifers. *Archiv Für Hydrobiologie* 138: 401-432.
- May, R., 1990. Taxonomy as destiny. *Nature* 347: 129-130.
- Mayr, E., 1942. Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist, New York.
- Mayr, E., 1982. The growth of biological thought: Diversity, evolution, and inheritance. Cambridge, Massachusetts.
- Mc Ivor, A.L., 2004. Freshwater mussels as biofilters, University of Cambridge, Cambridge. 142.
- Menesguen, A., 2003. Les "marrées vertes" en Bretagne, la responsabilité du Nitrate. *In*: Ifremer (ed.), Direction de l'environnement et de l'aménagement du littoral, Brest.
- Morrison, W.R., J.L. Lohr, P. Duchon, R. Wilches, D. Trujillo, M. Mair & S.S. Renner, 2009. The impact of taxonomic change on conservation: Does it kill, can it save, or is it just irrelevant? *Biological conservation* 142: 3201–3206.
- Myers, N., 1979. The Sinking Arch: A new look at the problem of disappearing species. Pergamon Press, New York.

- Nagel, K.O., 1992. Das Schalenwachstum dreier Muschelarten (Bivalvia: Unionidae) in der Schwalm, einem nordhessischen Mittelgebirgsfluß. *Decheniana* 145: 165-176.
- Nichols, R., 2001. Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 358-363.
- Nixon, K.C. & Q.D. Wheeler, 1990. An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6: 211-223.
- Obata, M., N. Sano, K. Kawamura & A. Komaru, 2007. Inheritance of two M type mitochondrial DNA from sperm and unfertilized eggs to offspring in *Mytilus galloprovincialis*. *Development, Growth and Differentiation* 49: 335-344.
- Olivier, M.-J., D. Martin, C. Bou & V. Prié, 2006. Interprétation du suivi hydrobiologique de la faune stygobie, réalisé sur le système karstique des Cent Fonts lors du pompage d'essai. Conseil Général de L'Hérault, Montpellier. 40pp.
- Ortmann, A.E., 1920. Correlation of shape and station in freshwater mussels (Naiades). *Proceedings of the American Philosophical Society* 59: 268-312.
- Padial, J.M. & C. Ibáñez, 2005. New records and comments for the Mauritanian mammal fauna. *Mammalia* 69: 239-245.
- Padial, J.M. & I. De la Rivera, 2007. Integrative taxonomists should use and produce DNA barcodes. *Zootaxa* 1586: 67-68.
- Paloc, H., 1979. Alimentation en eau de la ville de Montpellier – Localisation d'un emplacement de captage dans le réseau souterrain de la source du Lez – Détermination de ses principales caractéristiques en préalable à l'exécution des travaux. Rapport BRGM. 16 pp.
- Pennisi, E., 2008. Proposal to 'Wikify' GenBank Meets Stiff Resistance. *Science* 319: 1598-1599.
- Persat, H. & P. Keith, 2011. Biogéographie et historique de la mise en place des peuplements ichtyologiques de France métropolitaine. In P. Keith, H. Persat, E. Feunteun & J. Allardy (ed.), Les poissons d'eau douce de France., Biotope-Mèze and MNHN-Paris: 552
- Pillon, Y. & M.W. Chase, 2006. Taxonomic Exaggeration and Its Effects on Orchid Conservation. *Conservation Biology* 21: 263-265.
- Ponder, W.F. & D. Lunney, 1999. The other 99%: the conservation and biodiversity of invertebrates. Royal Zoological Society of New South Wales, Mosman, N.S.W., Australia.
- Popper, K. R. 1934. Logik der Forschung. Julius Springer Verlag, Vienna.
- Preston, S.J., A. Harrison, M. Lundy, D. Roberts, N. Beddoe & D. Rogowski, 2010. Square pegs in round holes - the implication of the shell shape variation on the translocation of adult *Margaritifera margaritifera* (L.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 20: 568-573.
- Prié, V., 2003. Notes sur les Mollusques du bassin du Lez (Hérault, France). *Documents Malacologiques* 4: 19-31.
- Prié, V., 2006. Moitessieriidae du Nord-Montpelliérain : Morphospecies et micro-répartition, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Montpellier. 44pp.
- Prié, V., 2008. Les escargots souterrains, nouveaux marqueurs des hydrosystèmes karstiques : application aux hydrosystèmes karstiques des massifs nord-montpelliérains. *Karstologia* 52: 7-16.
- Prié, V. & J.-M. Bichain, 2009. Phylogenetic relationships and description of a new stygobite species of *Bythinella* (Mollusca, Gastropoda, Caenogastropoda, Amnicolidae) from southern France. *Zoosystema* 31: 987-1000.
- Prié, V. & G. Cochet, 2010. Restaurer les fonctionnalités des écosystèmes : Proposition pour la réintroduction de l'esturgeon de l'Atlantique *Acipenser oxyrinchus* Mitchell, 1815 (Pisces, Acipenseridae) pour sauver la grande mulette *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) (Mollusca, Bivalvia, Margaritiferidae) de l'extinction. *MalaCo* 6: 270-277.
- Prié, V., 2012. Les sous-espèces de la Mulette méridionale *Unio mancus* Lamarck 1819 (Bivalvia, Unionidea) en France : descriptions originales et matériel topotypique. *MalaCo* 8: 428-446.
- Prié, V., N. Puillandre & P. Bouchet, 2012. Bad taxonomy can kill: molecular reevaluation of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Unionidae) and its accepted subspecies. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 405: 18 pp.
- Prié, V., 2013. Flagships and Umbrellas: unbalanced conservation effort towards charismatic species as potential threat to the unknown. *Tentacle* 21: 32-34.
- Prié, V., Q. Molina & B. Gamboa, 2013. French Naiad (Bivalvia: Margaritiferidae, Unionidae) Species Distribution Models: prediction maps as tools for conservation. *Hydrobiologia*. 14 pp.
- Prié, V. & N. Puillandre, 2013. Molecular phylogeny, taxonomy and distribution of French *Unio* species (Bivalvia, Unionidae). *Hydrobiologia*. 16 pp.

- Pringle, R.M., D.F. Doak, A.K. Brody, R. Jocqué & T.M. Palmer, 2010. Spatial Pattern Enhances Ecosystem Functioning in an African Savanna. *PLoS Biology* 8: e1000377.
- Puillandre, N., 2008. Taxonomie intégrative des Turridae : phylogénie, délimitation d'espèces et barcoding .Museum national d'Histoire naturelle à Paris. 244pp.
- Puillandre, N., M.V. Modica, Y. Zhang, L. Sirovitch, M.-C. Boisselier, C. Cruaud, M. Holford & S. Samadi, 2012. Large scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology* 21: 2671-2691.
- Rees, W.J., 1952. The role of amphibia in the dispersal of bivalve molluscs. *British Journal of Herpetology* 1.
- Reeves, P.A. & C.M. Richards, 2011. Species delimitation under the general lineage concept: an empirical example using wild North American Hops (Cannabaceae: *Humulus lupulus*). *Systematic Biology* 60: 45-59.
- Régnier, C., B. Fontaine & P. Bouchet, 2009. Not knowing, not recording, not listing: numerous unnoticed mollusk extinctions. *Conservation Biology* 23: 1214-1221.
- Robillard, M., 2010. Pygmées Baka et voisins dans la tourmente des politiques environnementales en Afrique centrale., Muséum national d'Histoire naturelle à Paris, Paris. 506.
- Rodary, E. & C. Castellagnet, 2003. Les trois temps de la conservation. In C.C. Rodary E., Rossi G. (ed.), Conservation de la nature et développement, l'intégration possible ? Paris 5-44.
- Rohlf, F.J., 1996. Morphometric spaces, shape components and the effect of linear transformations. In L. Marcus, M. Corti, L. A. & D. Slice (ed.), *Advances in Morphometrics*. Plenum Press, New York: 131-152.
- Roman, J. & J.J. McCarthy, 2010. The Whale Pump: Marine Mammals Enhance Primary Productivity in a Coastal Basin. *PLoS ONE* 5: e13255.
- Sabater, S., 2008. Alteration of the global water cycle and their effects on river structure, function and services. *Freshwater reviews* 1: 75-88.
- Sabater, S. & K. Tockner, 2010. Effects of Hydrologic Alterations on the Ecological Quality of River Ecosystems. In S. Sabater & D. Barcelo (eds.), *Water Scarcity in the Mediterranean: Perspectives Under Global Change*. Springer Berlin / Heidelberg: 15-39.
- Samadi, S. & A. Barberousse, 2006. The tree, the network, and the species. *Biological Journal of the Linnean Society* 89: 509-521.
- SANDRE, 2007. Base de données sur l'hydrographie, Service d'administration nationale des données et référentiels sur l'eau, Limoge. <http://www.sandre.eaufrance.fr/> consulté en 2013.
- Satta, Y., N. Toyohara, C. Ohtaka, Y. Tatsuno, T.K. Watanabe, E.T. Matsuura, S.I. Chigusa & N. Takahata, 1988. Dubious maternal inheritance of mitochondrial DNA in *D. simulans* and evolution of *D. mauritiana*. *Genetic research* 52: 1-6.
- Samadi, S. & A. Barberousse, 2009. Species: towards new, wellgrounded practices. A response to Velasco. *Biological Journal of the Linnean Society* 96: 696-708.
- Schlick-Steiner, B.C., F.M. Steiner, B. Seifert, C. Stauffer, E. Christian & R.H. Crozier, 2009. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology* 55: 421-438.
- Shea, C.P., J.T. Peterson, J.M. Wisniewski & N.A. Johnson, 2011. Misidentification of freshwater mussel species (Bivalvia:Unionidae): contributing factors, management implications, and potential solutions. *Journal of the North American Benthological Society* 30: 446-458.
- Sket, B., 1999. The nature of biodiversity in hypogean waters and how it is endangered. *Biodiversity and Conservation* 8: 1319-1338.
- Skibinski, D.O.F., C. Gallagher & C.M. Beynon, 1994a. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* 368: 817-818.
- Skibinski, D.O.F., C. Gallagher & C.M. Beynon, 1994b. Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* 138: 801-809.
- Soroka, M., 2010. Characteristics of mitochondrial DNA of Unionid bivalves (Mollusca: Bivalvia: Unionidae). I. Detection and characteristics of doubly uniparental inheritance (DUI) of Unionid mitochondrial DNA. *Folia malacologica* 18: 147-188.
- Soulé, M.E. & B.A. Wilcox, 1980. Conservation biology: An Evolutionary-Ecological Perspective. Sinauer Associates, Sunderland, Massachuset.
- Soulé, M.E., 1985. What is conservation biology? *BioScience* 35: 727-734.
- Steward, I., 1995. Nature's Numbers. Brockman, Inc., New York.

- Strayer, D.L., N.F. Caraco, J.J. Cole, S. Findlay & M.L. Pace, 1999. Transformation of freshwater ecosystems by bivalves. *BioScience* 49: 19-27.
- Thomsen, P.F., J. Kielgast, L.L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M.T.P. Gilbert, L. Orlando & E. Willerslev, 2011. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular ecology* 21(11): 2565-2578
- Tixier, M.-S., F. A. Hernandez, S. Guichou & S. Kreiter, 2011. The puzzle of DNA sequences of Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata) in the public GenBank database. *Invertebrate Systematics* 25: 389-406.
- Valledor De Lozoya, A. & R. Araujo, 2011. How the naiad was drawn: a Pre-linnean iconography of freshwater mussels. *Malacologia* 53: 381-402.
- Velecka, I. & L. Jüttner, 2000. Application of McKendrick-von Foerster's model of population dynamics to freshwater snails: specification of the model using laboratory experiments. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultas Rerum Naturalium* 38: 85-95.
- Wake, D.B. & V.T. Vredenburg, 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceeding of the National Academy of Science* 105: 11466-11473.
- Watters, G.T., 1994. Form and function of unionoidean shell sculpture and shape (Bivalvia). *American Malacological Bulletin* 11: 1-20.
- Waters, T., 2002. Species delimitation.
- Weisrock, A., 1997. Cent ans après Davis : la question des captures et les paléoréseaux hydrographiques quaternaires d'après les exemples de l'Europe du Nord-Ouest. *Géographie physique et Quaternaire* 51: 261-266.
- Wiens, J.J., 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic Biology* 56: 875-878.
- Wilcox, D., B. Dove, D. McDavid & D. Greer, 2002. Image Tool for Windows version 3.00. In: UTHSCA (ed.), UTHSCA, San Antonio.
- Wilke, T., G.M. Davis, A. Falsiowski, F. Giusti, M. Bodon & S. Magdalena, 2001. Molecular systematics of Hydrobiidae (Mollusca: Gastropoda: Rissooidea): testing monophyly and phylogenetic relationships. *Proceedings of the Academy of Natural Science of Philadelphia* 15: 1-21.
- Wilke, T., M. Haase, R. Hershler, H.P. Liu, B. Misof & W. Ponder, 2013. Pushing short DNA fragments to the limit: Phylogenetic relationships of 'hydrobioid' gastropods (Caenogastropoda: Rissooidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66: 715-736.
- Will, K.W., B.D. Mishler & Q.D. Wheeler, 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54: 844-851.
- Wilson, E.O., 1992. *The Diversity of Life*. The Penguin Press, London.
- Yeates, D., A. Seago, L. Nelson, S.E. Cameron, L. Joseph & J.W.H. Trueman, 2010. Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? *Systematic Entomology* 36: 209-217.
- Zieritz, A. & D.C. Aldridge, 2009. Identification of ecophenotypic trends within three European freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoidea) using traditional and modern morphometric techniques. *Biological Journal of the Linnean Society* 98: 814-825.
- Zieritz, A., J.I. Hoffman, W. Amos & D.C. Aldridge, 2010. Phenotypic plasticity and genetic isolation-by-distance in the freshwater mussel *Unio pictorum*. *Evolutionary Ecology* 24: 923-938.
- Zouros, E., K.R. Freeman, A.O. Ball & G.H. Pogson, 1992. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature* 359: 412-414.
- Zouros, E., A.O. Ball, C. Saavedra & K.R. Freeman, 1994a. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* 368: 818.
- Zouros, E., A.O. Ball, C. Saavedra & K.R. Freeman, 1994b. An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 7463-7467.

Glossaire

Crénicole : organisme qui vit dans les sources.

Ctenidie : "branchie" des bivalves, qui sert aussi à la nutrition et, pour les femelles, à abriter les œufs (marsupium).

Glochidie : désigne la larve des naïades dont les jeunes stades parasitent des poissons.

Hyporhéique : se dit du milieu situé sous le lit des rivières. Il s'agit d'un milieu intermédiaire entre le milieu souterrain et le milieu épigée, abrité des rayons du soleil, oxygéné par l'écoulement de l'eau, riche en matière organique mais colonisé également par des organismes épigées (donc avec une concurrence plus importante que dans le milieu souterrain stricte).

Marsupium : ctenidie modifiée abritant les œufs.

Naïades : Ici, le terme "naïade" désigne les grandes espèces de bivalves continentaux, soit pour la France les Unionidae et les Margaritiferidae.

Stygobie : organisme strictement inféodé au milieu souterrain aquatique.

Stygoxène : organisme habitant temporairement ou occasionnellement les eaux souterraines.

Stygophile : organisme fortement liés au milieu souterrain, mais effectuant une partie de son cycle vital à l'extérieur.

Vadose : zone sèche du karst, par opposition à la zone noyée (ou saturée).

Annexe I : liste des spécimens de bivalves collectés

N° MNHN _ INVMAR		N° station	date	latitude	longitude	River	collector(s)	species	
IM	2009	12563	MO-000007	200907	47,0112	0,565503	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	12564	MO-000007	200907	47,0112	0,565503	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12565	MO-000019	200907	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	12566	MO-000007	200907	47,0112	0,565503	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12567	MO-000007	200907	47,0112	0,565503	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	12568	MO-000013	200907	46,591	0,343164	Clain	Philippe Bousquet	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	12569	MO-000004	200907	43,5528	3,48339	Hérault	Benjamin Adam	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	12570	MO-000005	200907	43,8054	3,76741	Lamalou	Benjamin Adam	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	12571	MO-000001	200907	43,4432	6,55648	Argens	Benjamin Adam	<i>Unio mancus turtonii</i>
IM	2009	12572	MO-000004	200907	43,5528	3,48339	Hérault	Vincent Prié	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	12573	MO-000016	200909	49,8306	4,77228	Meuse	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12574	MO-000016	200909	49,8306	4,77228	Meuse	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12575	MO-000016	200909	49,8306	4,77228	Meuse	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12576	MO-000017	200909	49,8345	4,75353	Meuse	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12577	MO-000017	200909	49,8345	4,75353	Meuse	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12578	MO-000018	200909	49,694	4,81318	Meuse	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12579	MO-000001	200907	43,4432	6,55648	Argens	Benjamin Adam	<i>Unio mancus turtonii</i>
IM	2009	12580	MO-000001	200907	43,4432	6,55648	Argens	Benjamin Adam	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2009	12581	MO-000003	200907	44,125	4,68379	Cèze	Benjamin Adam	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	12582	MO-000002	200907	44,2837	4,60203	Ardèche	Benjamin Adam	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	12583	MO-	20120503	49,8661	4,11758	Goujon	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	12584	MO-001177	2011	48,8394	5,95602	Esch	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	12585	MO-000011	20090907	46,4292	0,217754	Vonne	Philippe Bousquet	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	12586	MO-000008	20090709	46,6363	0,362523	Auxance	Philippe Bousquet	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12587	MO-000012	20090907	46,4058	0,203466	Longère	Philippe Bousquet	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12588	MO-000014	20090709	45,1927	-0,210908	Lary	Philippe Bousquet	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12589	MO-000014	20090709	45,1927	-0,210908	Lary	Philippe Bousquet	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12590	MO-000010	20090907	46,4625	0,2101	Palais	Philippe Bousquet	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12591	MO-000009	20090907	46,5723	0,288656	Boivre	Philippe Bousquet	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12592	MO-000009	20090907	46,5723	0,288656	Boivre	Philippe Bousquet	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12593	MO-000007	200907	47,0112	0,565503	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12594	MO-000007	200907	47,0112	0,565503	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio sp.</i>

IM	2009	12595	MO-000007	200907	47,0112	0,565503	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12596	MO-000006	201003	45,71478422	-0,560283625	Charente	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
IM	2009	12597	MO-000006	201003	45,71478422	-0,560283625	Charente	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
IM	2009	12598	MO-000015	201006	43,58701258	-0,433285239	Loutz	Ludwig Simon	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12599	MO-000015	201006	43,58701258	-0,433285239	Loutz	Ludwig Simon	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12600	MO-000515	201007	43,9947	1,12906	Garonne	Philippe Bousquet	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12601	MO-000040	201007	43,7154	1,24418	Save	Philippe Bousquet	<i>Margaritifera auricularia</i>
IM	2009	12602	MO-000765	20100702	45,6049	-0,535013	Seugne	Philippe Bousquet	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12603	MO-000763	20100702	45,6474	-0,547566	Seugne	Philippe Bousquet	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12604	MO-000765	20100702	45,6049	-0,535013	Seugne	Philippe Bousquet	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12605	MO-000019	20100718	45,3092	4,78437	Rhône	Vincent Prié	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	12606	MO-000024	20100913	48,4002	3,12521	Seine	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12607	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12608	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12609	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12610	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12611	MO-000311	20100731	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
IM	2009	12612	MO-000962	201008	44,3775	4,43571	Ardèche	Benjamin Adam	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	12613	MO-000962	201008	44,3775	4,43571	Ardèche	Benjamin Adam	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	12614	MO-000962	201008	44,3775	4,43571	Ardèche	Benjamin Adam	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	12615	MO-000285	20100731	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
IM	2009	12616	MO-000285	20100731	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12617	MO-000193	2009	46,5764	0,28875	Boivre	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12618		20120503	49,8661	4,11758	Goujon	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	12619		20120503	49,8661	4,11758	Goujon	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	12620	MO-000018	2009	49,694	4,81318	Meuse	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12621	MO-000777	20090907	45,1921	-0,211006	Lary	Philippe Bousquet	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	12622	MO-000413	200909	45,7795	0,08538	Charente	Philippe Bousquet	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	12623	MO-001177	2011	48,8394	5,95602	Esch	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	12624	MO-001177	2011	48,8394	5,95602	Esch	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	12625	MO-001177	2011	48,8394	5,95602	Esch	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	12626	MO-000042	201008	43,6933	1,2295	Save	Benjamin Adam	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	12627	MO-000043	201008	43,6804	1,2087	Save	Benjamin Adam	<i>Potomida littoralis</i>

IM	2009	12628	MO-000044	201008	43,6685	1,19074	Save	Benjamin Adam	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	12629	MO-000325	2010	47,01706183	0,563052818	Vienne	Laurent Philippe	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12630	MO-000326	2010	47,01706183	0,563052818	Vienne	Laurent Philippe	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12631	MO-000329	2010	47,01706183	0,563052818	Vienne	Laurent Philippe	<i>Unio mancus mancus</i>
No voucher specimen			MO-000287	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000288	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000289	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000291	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000292	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000294	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000295	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000296	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000297	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000298	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000299	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000300	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000301	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000302	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000303	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000304	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000305	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000306	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000307	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000308	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000309	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
No voucher specimen			MO-000310	20100922	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
IM	2009	12655	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12656	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12657	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12658	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12659	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12660	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12661	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>

IM	2009	12662	MO-000859	20100902	43,67163976	-1,008365927	Luy	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
IM	2009	12663	MO-000858	20100902	43,67163976	-1,008365927	Luy	Vincent Prié	<i>Margaritifera auricularia</i>
IM	2009	12664	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12665	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12666	MO-000421	20100921	46,4619	-0,081111	Vonne	Michel Bramard	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12667	MO-000421	20100921	46,4619	-0,081111	Vonne	Michel Bramard	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12668	MO-000421	20100921	46,4619	-0,081111	Vonne	Michel Bramard	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12669	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12670	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12671	MO-000805	20100915	49,3983	3,47401	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12672	MO-000312	20100927	44,9451174	3,234126262	Truyère	Vincent Prié	<i>Margaritifera margaritifera</i>
IM	2009	12673	MO-000960	2010	45,9286	8,72822	Lac Maggiore	Oscar Ravera	<i>Unio elongatulus</i>
IM	2009	12674	MO-000960	2010	45,9286	8,72822	Lac Maggiore	Oscar Ravera	<i>Unio elongatulus</i>
IM	2009	12675	MO-000960	2010	45,9286	8,72822	Lac Maggiore	Oscar Ravera	<i>Unio elongatulus</i>
IM	2009	12676	MO-000955	20100928	49,905	4,15916	Petit Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	12677	MO-000955	20100928	49,905	4,15916	Petit Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12678	MO-000937	201009	49,9104	3,81267	Oise	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	12679	MO-000920	201009	49,8906	3,96788	Ton	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12680	MO-000955	20100928	49,905	4,15916	Petit Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12681	MO-000953	20100928	49,9159	4,1852	Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	12682	MO-000953	20100928	49,9159	4,1852	Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	12683	MO-000936	201009	49,881	3,54309	Oise	Xavier Cucherat	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12684	MO-000940	201009	49,7858	3,88418	Brune	Xavier Cucherat	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2009	12685	MO-000925	201009	49,7981	3,45387	Oise	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12686	MO-000918	201009	49,8594	3,50928	Oise	Xavier Cucherat	<i>Pseudanodonta complanata</i>
IM	2009	12687	MO-000937	201009	49,9104	3,81267	Oise	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12688	MO-000936	201009	49,881	3,54309	Oise	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12689	MO-000933	20100927	49,9777	3,70799	Noir Rieu	Xavier Cucherat	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2009	12690	MO-000933	20100927	49,9777	3,70799	Noir Rieu	Xavier Cucherat	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2009	12691	MO-000955	20100928	49,905	4,15916	Petit Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12692	MO-000933	20100927	49,9777	3,70799	Noir Rieu	Xavier Cucherat	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2009	12693	MO-000955	20100928	49,905	4,15916	Petit Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12694	MO-000919	201009	49,956	3,77894	Iron	Xavier Cucherat	<i>Anodonta sp.</i>

IM	2009	12695	MO-000961	20100601	48,4601	3,34166	Seine	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12696	MO-000961	20100601	48,4601	3,34166	Seine	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12697	MO-000961	20100601	48,4601	3,34166	Seine	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12698	MO-000958	20101027	46,2631	4,81778	Saône	Henri Persat	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	12699	MO-000959	20080710	46,2644	5,42917	Suran	Henri Persat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	12700	MO-000493	20100805	44,1292	1,81913	Aveyron	Philippe Bousquet	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	12701	MO-001124	20110225	45,7315	5,7972	Bourget	Vincent Prié	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	12702	MO-001124	20110225	45,7315	5,7972	Bourget	Vincent Prié	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	12703	MO-001124	20110225	45,7315	5,7972	Bourget	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12704	MO-001124	20110225	45,7315	5,7972	Bourget	Vincent Prié	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	12705	MO-001124	20110225	45,7315	5,7972	Bourget	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12706	MO-001124	20110225	45,7315	5,7972	Bourget	Vincent Prié	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	12707	MO-001124	20110225	45,7315	5,7972	Bourget	Vincent Prié	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	12708	MO-001124	20110225	45,7315	5,7972	Bourget	Vincent Prié	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	12709	MO-001124	20110225	45,7315	5,7972	Bourget	Vincent Prié	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	12710	MO-001164	20110608	46,1829	-0,272333	Belle	Michel Bramard	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12711	MO-001164	20110608	46,1829	-0,272333	Belle	Michel Bramard	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12712	MO-001164	20110609	46,1829	-0,272333	Belle	Michel Bramard	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12713	MO-001164	20110609	46,1829	-0,272333	Belle	Michel Bramard	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12714	MO-001164	20110609	46,1829	-0,272333	Belle	Michel Bramard	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12715	MO-001095	20100917	45,6321	-0,385341	Né (Charente)	Michel Bramard	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12716	MO-001095	20100917	45,6321	-0,385341	Né (Charente)	Michel Bramard	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12717	MO-001095	20100917	45,6321	-0,385341	Né (Charente)	Michel Bramard	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	12718	MO-000994	20110416	43,3624	3,44606	Hérault	Vincent Prié	<i>Sinanodonta woodiana</i>
IM	2009	12719	MO-000994	20110416	43,3624	3,44606	Hérault	Vincent Prié	<i>Sinanodonta woodiana</i>
IM	2009	12720	MO-001173	20110624	48,3038	2,77903	Lunain	M.P. Pinon	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12721	MO-001904	20120830	48,7851	3,02014	Aubetin	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	12722	MO-001905	20120830	48,2582	2,42703	Essonne	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	12723	MO-001109	20110513	41,7104	8,82829	Taravu	Vincent E. Jacquin	<i>Unio mancus turtonii</i>
IM	2009	12724	MO-001109	20110513	41,7104	8,82829	Taravu	Vincent Prié	<i>Unio mancus turtonii</i>
IM	2009	12725	MO-001109	20110513	41,7104	8,82829	Taravu	Vincent Prié	<i>Unio mancus turtonii</i>
IM	2009	12726	MO-001109	20110513	41,7104	8,82829	Taravu	Vincent Prié	<i>Unio mancus turtonii</i>
IM	2009	12727	MO-001109	20110513	41,7104	8,82829	Taravu	Vincent Prié	<i>Unio mancus turtonii</i>

IM	2009	12761	MO-001113	20110515	42,1168	9,48944	Taviganu	Vincent Prié	<i>Unio mancus turtonii</i>
IM	2009	12762	MO-001113	20110515	42,1168	9,48944	Taviganu	Vincent Prié	<i>Unio mancus turtonii</i>
IM	2009	21815	MO-001113	20110515	42,1168	9,48944	Taviganu	Vincent Prié	<i>Unio mancus turtonii</i>
IM	2009	17750	MO-001113	20110515	42,1168	9,48944	Taviganu	Vincent Prié	<i>Unio mancus turtonii</i>
IM	2009	17751	MO-001113	20110515	42,1168	9,48944	Taviganu	Vincent Prié	<i>Unio mancus turtonii</i>
IM	2009	17752	MO-001113	20110515	42,1168	9,48944	Taviganu	Vincent Prié	<i>Unio mancus turtonii</i>
IM	2009	17753	MO-001174	20080401	49,401	3,89971	Aisne	Erwann Jacquin -	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17754	MO-001174	20101104	49,401	3,89971	Aisne	Erwann Jacquin -	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	17755	MO-001174	20101104	49,401	3,89971	Aisne	Erwann Jacquin -	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	17756	MO-001174	20101104	49,401	3,89971	Aisne	Erwann Jacquin -	<i>Corbicula fluminea</i>
IM	2009	17757	MO-001174	20101104	49,401	3,89971	Aisne	Erwann Jacquin -	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17758	MO-001174	20101104	49,401	3,89971	Aisne	Erwann Jacquin -	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17759	MO-001175	20101104	49,419	4,00421	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17760	MO-001175	20101104	49,419	4,00421	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17761	MO-001175	20101104	49,419	4,00421	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	17762	MO-001176	20101104	49,4474	4,04998	Aisne	Vincent Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2009	17763	MO-001176	20101104	49,4474	4,04998	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	17764	MO-001176	20101104	49,4474	4,04998	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17765	MO-001176	20101104	49,4474	4,04998	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	17766	MO-001176	20101104	49,4474	4,04998	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	17767	MO-001176	20101104	49,4474	4,04998	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	N° P. M	MO-000994	20110721	43,3624	3,44606		Vincent Prié	<i>Sinanodonta woodiana</i>
IM	2009	N° P. M	MO-000994	20110721	43,3624	3,44606		Vincent Prié	<i>Sinanodonta woodiana</i>
IM	2009	17771	MO-001717	20110709	49,9243	2,75054	Somme	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17772	MO-001689	20110709	49,9329	2,81184	Somme	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17773	MO-001660	20111111	49,9034	2,64873	Somme	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17774	MO-001139	20110709	43,6675	-1,00571	Basse	Vincent Prié	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	17776	MO-001148	20110609	44,21574478	-1,223716864	Etang d'Aureilhan	Vincent Prié,	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	17784	MO-001068	20110527	42,5318	9,48272	Golo	Jose Matei	<i>Unio mancus turtonii</i>
IM	2009	17785	MO-001140	20110613	48,0139	-3,459	Ellé (affluent)	Pierre-Yves Pasco	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	17786	MO-001140	20110613	48,0139	-3,459	Ellé (affluent)	Pierre-Yves Pasco	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	17787	MO-001140	20110613	48,0139	-3,459	Ellé (affluent)	Pierre-Yves Pasco	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	17788	MO-001140	20110613	48,0139	-3,459	Ellé (affluent)	Pierre-Yves Pasco	<i>Unio mancus mancus</i>

IM	2009	17789	MO-001113	20110515	42,1168	9,48944	Tavignanu	Vincent Prié	<i>Unio mancus turtonii</i>
IM	2009	17790	MO-001403	20110922	49,3934	3,65517	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	17791	MO-001403	20110922	49,3934	3,65517	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17792	MO-001403	20110922	49,3934	3,65517	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	17793	MO-001403	20110922	49,3934	3,65517	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17794	MO-001403	20110922	49,3934	3,65517	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17795	MO-001403	20110922	49,3934	3,65517	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17796	MO-001403	20110922	49,3934	3,65517	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	17797	MO-001403	20110922	49,3934	3,65517	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17798	MO-001403	20110922	49,3934	3,65517	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17799	MO-001403	20110922	49,3934	3,65517	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17800	MO-001403	20110922	49,3934	3,65517	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	17801	MO-001403	20110503	49,3934	3,65517	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17802	MO-001403	20110503	49,3934	3,65517	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17803	MO-001403	20110609	49,3934	3,65517	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	17804	MO-001175	2011	49,419	4,00421	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17805	MO-001175	2011	49,419	4,00421	Aisne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	17806	MO-000959	201105	46,2644	5,42917	Suran	Henri Persat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	17807	MO-000959	201105	46,2644	5,42917	Suran	Henri Persat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	17808	MO-000959	201105	46,2644	5,42917	Suran	Henri Persat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	17809	MO-000959	201105	46,2644	5,42917	Suran	Henri Persat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	17810	MO-001161	20110618	48,9033	3,19906	Petit Morin	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	17811	MO-001531	20110323	49,5063	1,97192	Thérain	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	17812	MO-001161	201103	48,9033	3,19906	Petit Morin	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	17813	MO-001161	201103	48,9033	3,19906	Petit Morin	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	17814	MO-001161	201103	48,9033	3,19906	Petit Morin	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	17815	MO-001139	20110709	42,6762	2,8225	Basse	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	17816	MO-001139	20110709	42,6762	2,8225	Basse	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	17817	MO-001139	20110709	42,6762	2,8225	Basse	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	17818	MO-001139	20110709	42,6762	2,8225	Basse	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	17819	MO-001139	20110709	42,6762	2,8225	Basse	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	17820	MO-001139	20110709	42,6762	2,8225	Basse	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	17821	MO-001139	20110709	42,6762	2,8225	Basse	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>

IM	2009	17822	MO-001908	20120830	42,0299	2,5844	Aff. Le Ter	Vincent Prié	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	17823	MO-001908	20120830	42,0299	2,5844	Aff. Le Ter	Vincent Prié	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	17824	MO-001908	20120702	42,0299	2,5844	Aff. Le Ter	Vincent Prié	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	17825	MO-001908	20120702	42,0299	2,5844	Aff. Le Ter	Benjamin Adam	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	17826	MO-001908	20120702	42,0299	2,5844	Aff. Le Ter	Benjamin Adam	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	17827	MO-001909	20120926	42,1695	2,73021	Le Ser	Vincent Prié	<i>Unio ravoisieri</i>
IM	2009	17828	MO-001909	20120926	42,1695	2,73021	Le Ser	Vincent Prié	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	17829	MO-001909	20120926	42,1695	2,73021	Le Ser	Vincent Prié	<i>Unio ravoisieri</i>
IM	2009	17830	MO-001909	20210831	42,1695	2,73021	Le Ser	Vincent Prié	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	17831	MO-001909	20210831	42,1695	2,73021	Le Ser	Vincent Prié	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	17832	MO-001907	20120830	42,1283	2,75509	Lac de Bagnoles	Vincent Prié	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	17833	MO-001907	20120830	42,1283	2,75509	Lac de Bagnoles	Vincent Prié	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	17834	MO-001907	20120830	42,1283	2,75509	Lac de Bagnoles	Vincent Prié	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	17835	MO-001152	20110716	43,4609	-1,52691	Etang de Brindos	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17836	MO-001152	20110716	43,4609	-1,52691	Etang de Brindos	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17837	MO-001152	20110716	43,4609	-1,52691	Etang de Brindos	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17838	MO-001152	20110716	43,4609	-1,52691	Etang de Brindos	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17839	MO-001152	20110716	43,4609	-1,52691	Etang de Brindos	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	17840	MO-000939	20110707	49,8758	4,09198	Thon	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17841	MO-000939	20110707	49,8758	4,09198	Thon	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17842	MO-001775	20120830	49,8859	4,24939	Petit Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	17843	MO-001776	20120830	46,6372	0,355388	Petit Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17844	MO-001776	20120830	46,6372	0,355388	Petit Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17845	MO-001776	20120830	46,6372	0,355388	Petit Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17846	MO-001776	20120830	46,6372	0,355388	Petit Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17847	MO-001776	20120830	46,6372	0,355388	Petit Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17848	MO-001776	20120830	46,6372	0,355388	Petit Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	17768	MO-001776	20120830	46,6372	0,355388	Petit Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17769	MO-001776	20120830	46,6372	0,355388	Petit Gland	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	17770	MO-000939	20110707	49,8758	4,09198	Thon	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	17775	MO-001200	201110	43,6842	4,69523	Etang de la Gravière	Vincent Prié	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	21208	MO-001188	20110721	45,3625	4,76	Rhône	Henri Persat	<i>Unio mancus (?)</i>
IM	2009	21209	MO-001185	2011	48,5723	7,68498	Kanal	Antoine Wagner	<i>Unio tumidus</i>

IM	2009	21210	MO-001185	2011	48,5723	7,68498	Kanal	Antoine Wagner	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	21211	MO-001185	20110825	48,5723	7,68498	Kanal	Antoine Wagner	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	21212	MO-001186	20110825	48,5692	7,68	Kanal	Antoine Wagner	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	21213	MO-001187	20110825	48,5765	7,67619	Kanal	Antoine Wagner	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	21214	MO-001199	201107	43,53834431	-1,019590114	Gave de Pau	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	21215	MO-001199	201107	43,53834431	-1,019590114	Gave de Pau	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	21216	MO-001199	201110	43,53834431	-1,019590114	Gave de Pau	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	21217	MO-001462		49,1907	3,40651	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21218	MO-001454		49,1944	3,24928	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	21219	MO-001462		49,1907	3,40651	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	21220	MO-001456	20110609	49,191	3,30816	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	21221	MO-001466		49,1789	3,56459	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	21222	MO-001451		49,1876	3,16963	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	21223	MO-001458		49,1897	3,38446	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	21224	MO-001454		49,1944	3,24928	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	21225	MO-001451		49,1876	3,16963	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	21226	MO-001458		49,1897	3,38446	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21227	MO-001458	20110609	49,1897	3,38446	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	21228	MO-001462		49,1907	3,40651	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	21229	MO-001476		49,0908	3,06316	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	21230	MO-001466		49,1789	3,56459	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	21231	MO-001454		49,1944	3,24928	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	21232	MO-001462		49,1907	3,40651	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	21233	MO-001476		49,0908	3,06316	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	21234	MO-001476		49,0908	3,06316	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	21235	MO-001476		49,0908	3,06316	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	21236	MO-001476		49,0908	3,06316	Ourcq	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	21237	MO-001191	20111110	48,8375	5,99865	Esch	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21238	MO-001192	20111110	48,1341	4,34772	Seine	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21239	MO-001191	20111110	48,8375	5,99865	Esch	Florent Lamand	<i>Unio crassus</i>
IM	2009	21240	MO-001191	20111110	48,8375	5,99865	Esch	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21241	MO-001192	20111110	48,1341	4,34772	Seine	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21242	MO-001192	20111110	48,1341	4,34772	Seine	Florent Lamand	<i>Unio mancus requienii</i>

IM	2009	21243	MO-001192	20111110	48,1341	4,34772	Seine	Florent Lamand	<i>Unio crassus</i>
IM	2009	21244	MO-001192	20111112	48,1341	4,34772	Seine	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21245	MO-001192	20111112	48,1341	4,34772	Seine	Florent Lamand	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	21246	MO-001193	20111112	49,1319	5,8091	Longeau	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21247	MO-001193	20111124	49,1319	5,8091	Longeau	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21248	MO-001193	20111124	49,1319	5,8091	Longeau	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21249	MO-001194	20111124	48,0627	4,05216	Armance	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21250	MO-001194	20111124	48,0627	4,05216	Armance	Florent Lamand	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	21251	MO-001194	20111124	48,0627	4,05216	Armance	Florent Lamand	<i>Unio crassus</i>
IM	2009	21252	MO-001194	20111124	48,0627	4,05216	Armance	Florent Lamand	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2009	21253	MO-001195	20111124	49,1714	5,8533	Orne	Florent Lamand	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	21254	MO-001195	20111124	49,1714	5,8533	Orne	Florent Lamand	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	21255	MO-001195	20111124	49,1714	5,8533	Orne	Florent Lamand	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	21256	MO-001195	20111130	49,1714	5,8533	Orne	Florent Lamand	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	21257	MO-001196	20111130	48,2696	4,62145	Aube	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21258	MO-001196	20111130	48,2696	4,62145	Aube	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21259	MO-001196	20111130	48,2696	4,62145	Aube	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21260	MO-001197	20111130	49,8351	4,47736	Sormonne	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21261	MO-001197	20111130	49,8351	4,47736	Sormonne	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21262	MO-001197	20111125	49,8351	4,47736	Sormonne	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21263	MO-001198	2011107	48,3669	4,02205	Grand Melda	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21264	MO-001198	2011107	48,3669	4,02205	Grand Melda	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21265	MO-001198	2011107	48,3669	4,02205	Grand Melda	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	21266	MO-001198	2011107	48,3669	4,02205	Grand Melda	Florent Lamand	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	21267	MO-001201	2011110	47,0153	4,44773	Drée	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21268	MO-001201	2011107	47,0153	4,44773	Drée	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21269	MO-001201	20120104	47,0153	4,44773	Drée	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21270	MO-001201	20120122	47,0153	4,44773	Drée	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21271	MO-001201	20110809	47,0153	4,44773	Drée	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21272	MO-001201	20110809	47,0153	4,44773	Drée	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21273	MO-001202	20110809	47,0102	4,34259	Drée	Vincent Prié	<i>Corbicula fluminea</i>
IM	2009	21274	MO-001209	20110803	47,2823	0,017218	Authion	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21275	MO-001209	20110803	47,2823	0,017218	Authion	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>

IM	2009	21276	MO-001209	20110609	47,2823	0,017218	Authion	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21277	MO-001906	20120830	47,2763	0,029796	Etrepes	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21278	MO-001906	20120830	47,2763	0,029796	Etrepes	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21279	MO-001906	20120830	47,2763	0,029796	Etrepes	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21280	MO-001906	20120830	47,2763	0,029796	Etrepes	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21281	MO-001906	20120830	47,2763	0,029796	Etrepes	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21282	MO-001906	20120830	47,2763	0,029796	Etrepes	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21283	MO-001906	20120830	47,2763	0,029796	Etrepes	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21284	MO-001490	20110705	49,3072	1,11065	Eure	Xavier Cucherat	<i>Pseudanodonta complanata</i>
IM	2009	21285	MO-001490	20110705	49,3072	1,11065	Eure	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	21286	MO-001490	20110705	49,3072	1,11065	Eure	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	21287	MO-001490	20110705	49,3072	1,11065	Eure	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	21288	MO-001491	20110705	49,3066	1,11522	Eure	Xavier Cucherat	<i>Corbicula fluminalis</i>
IM	2009	21289	MO-001491	20110705	49,3066	1,11522	Eure	Xavier Cucherat	<i>Corbicula fluminalis</i>
IM	2009	21290	MO-001491	20110705	49,3066	1,11522	Eure	Xavier Cucherat	<i>Corbicula fluminalis</i>
IM	2009	21291	MO-001492	20110705	49,3066	1,11522	Eure	Xavier Cucherat	<i>Corbicula fluminea</i>
IM	2009	21292	MO-001492	20110318	49,3066	1,11522	Eure	Xavier Cucherat	<i>Corbicula fluminea</i>
IM	2009	21293	MO-001240	20110609	46,7848	2,41978	Cher	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21294	MO-001240	20110609	46,7848	2,41978	Cher	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21295	MO-001240	20110609	46,7848	2,41978	Cher	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21296	MO-001240	20110609	46,7848	2,41978	Cher	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21297	MO-001240	20110609	46,7848	2,41978	Cher	Vincent Prié	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	21298	MO-001240	20110609	46,7848	2,41978	Cher	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21299	MO-001240	20110609	46,7848	2,41978	Cher	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21300	MO-001240	20110609	46,7848	2,41978	Cher	Vincent Prié	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21301	MO-001243	20110811	46,49824956	2,617005392	Cher	Laurent Philippe	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	21302	MO-001242	20110609	48,5089	-1,82304	Etang de Beaufort	Patrick Lema	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21303	MO-001242	20110609	48,5089	-1,82304	Etang de Beaufort	Patrick Lema	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21304	MO-001242	20110609	48,5089	-1,82304	Etang de Beaufort	Patrick Lema	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21305	MO-001242	20110609	48,5089	-1,82304	Etang de Beaufort	Patrick Lema	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21306	MO-001242	20110811	48,5089	-1,82304	Etang de Beaufort	Patrick Lema	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	21307	MO-001242	20110811	48,5089	-1,82304	Etang de Beaufort	Patrick Lema	<i>Unio mancus mancus</i>
IM	2009	22386	MO-001247	20110811	43,2911	-0,874938	Ain	Henri Persat	<i>Unio mancus requienii</i>

IM	2009	22387	MO-001247	20110811	43,2911	-0,874938	Ain	Henri Persat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	22388	MO-001247	20110811	43,2911	-0,874938	Ain	Henri Persat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	22389	MO-001247	20110811	43,2911	-0,874938	Ain	Henri Persat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	22390	MO-001247	20110811	43,2911	-0,874938	Ain	Henri Persat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	22391	MO-001249	20110811	45,5528	5,79716	Aiguebelette	Henri Persat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	22392	MO-001248	20110811	46,2385	4,80848	Saône	Henri Persat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	22393	MO-001248	20110811	46,2385	4,80848	Saône	Henri Persat	<i>Unio tumidus</i>
IM	2009	22394	MO-001248	20110811	46,2385	4,80848	Saône	Henri Persat	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	22395	MO-001247	20110811	43,2911	-0,874938	Ain	Henri Persat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	22396	MO-001250	20110811	48,9395	-1,03381	Vire	Olivier Hesnard et Benoit Lecaplain	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	22397	MO-001251	20110811	49,0908	-1,11513	Vire	Olivier Hesnard et Benoit Lecaplain	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	22398	MO-001252	20110812	49,4807	4,59176	Aisne	Florent Lamand	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	22399	MO-001252	20110812	49,4807	4,59176	Aisne	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	22400	MO-001252	20110812	49,4807	4,59176	Aisne	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	22401	MO-001253	20110812	49,5586	4,34357	Plumion	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2009	22402	MO-001253	20110812	49,5586	4,34357	Plumion	Florent Lamand	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	22403	MO-001241	20110609	46,7905	2,40301	Cher	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	22404	MO-000372		47,0186	0,561077	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	22405	MO-000372		47,0186	0,561077	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus</i>
IM	2009	22406	MO-000372		47,0186	0,561077	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	22407	MO-000372		47,0186	0,561077	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus</i>
IM	2009	22408	MO-000372		47,0186	0,561077	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus</i>
IM	2009	22409	MO-000372		47,0186	0,561077	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	22410	MO-000372		47,0186	0,561077	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	22411	MO-000372		47,0186	0,561077	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	22412	MO-000372		47,0186	0,561077	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	22413	MO-000372		47,0186	0,561077	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2009	22414	MO-000372		47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	22415	MO-000372		47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	22416	MO-000310		47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	22417	MO-000310		47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	22418	MO-000310		47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>

IM	2009	22419	MO-000310		47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	22420	MO-000310		47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	22421	MO-000310		47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2009	22422		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	22423		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	22424		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	22425		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	22426		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	22427		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	22428		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2009	22429		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	22430		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	22431		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2009	22432		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	22433		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	22434		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2009	22435		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2013	7195		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2013	7196		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2013	7197		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2013	7198		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2013	7199		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2013	7200		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio pictorum</i>
IM	2013	7201		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2013	7202		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2013	7203		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio sp.</i>
IM	2013	7204		20120725	47,48001	3,90844	Le Cousin	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus</i>
IM	2013	7205		20120725	47,48001	3,90844	Le Cousin	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2013	7206		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7207		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7208		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7209		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus</i>
IM	2013	7210		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus</i>

IM	2013	7211		20120727	47,43723	3,77551	La Cure	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>
IM	2013	7212	MO-001136	20120829	43,6675	-1,00571	Luy	Charlie Pichon	<i>Margaritifera auricularia</i>
	No voucher specimen	MO-04132		20120726	43,3925	0,031332	Canal de Luzertz	Vincent Prié	<i>Margaritifera margaritifera</i>
	No voucher specimen	MO-04132		20120726	43,3925	0,031332	Canal de Luzertz	Vincent Prié	<i>Margaritifera margaritifera</i>
	No voucher specimen	MO-04132		20120726	43,3925	0,031332	Canal de Luzertz	Vincent Prié	<i>Margaritifera margaritifera</i>
	No voucher specimen	MO-04132		20120726	43,3925	0,031332	Canal de Luzertz	Vincent Prié	<i>Margaritifera margaritifera</i>
	No voucher specimen	MO-04132		20120726	43,3925	0,031332	Canal de Luzertz	Vincent Prié	<i>Margaritifera margaritifera</i>
IM	2013	7218	MO-004440	20210831	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7219	MO-004440	20210831	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7220	MO-004440	20210831	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7221	MO-004440	20120704	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7222	MO-004440	20120704	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7223	MO-004440	20120704	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7224	MO-004440	20121007	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7225	MO-004440	20100526	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7226	MO-004440		43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7227	MO-004440	201210	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7228	MO-004440	201210	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7229	MO-004440	20120927	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7230	MO-004440	20120326	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7231	MO-004440	20120326	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7232	MO-004440	20120326	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7233	MO-004440	20120927	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7234	MO-004440		43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7235	MO-004440	20110609	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7236	MO-004440		43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7237	MO-004440		43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7238	MO-004440		43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7239	MO-004440		43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7240	MO-004440		43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7241	MO-004440		43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7242	MO-004440		43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7243	MO-004440	20090827	43,68401245	-0,226473162	Adour	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>

IM	2013	7244	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7245	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7246	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7247	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7248	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7249	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7250	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7251	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7252	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7253	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7254	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7255	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7256	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7257	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7258	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7259	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus</i>
IM	2013	7260	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7261	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7262	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7263	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7264	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7265	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7266	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7267	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7268	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7269	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7270	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7271	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7272	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7273	MO-04455		43,84469434	4,773833362	Canal des Alpines	Vincent Prié	<i>Potomida littoralis</i>
IM	2013	7274	MO-04463		46,24907103	3,195975346	Bouble	Sylvain Vrignaud	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2013	7275	MO-04463		46,24907103	3,195975346	Bouble	Sylvain Vrignaud	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2013	7276			48,77227	3,17833	Ru du Vannetin	Xavier Cucherat	<i>Unio mancus requienii</i>

IM	2013	7277			48,77227	3,17833	Ru du Vannetin	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2013	7278			48,77227	3,17833	Ru du Vannetin	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2013	7279	MO-04466		49,65342149	4,856005112	Meuse	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7280	MO-01945	20120726	48,9503	5,50256	Meuse	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7281	MO-04342	20120726	50,1886	4,07824	R. de l'Ecrevisse	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7282	MO-01912	20090827	50,2649	4,18096	La Hante	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7283	MO-01912	20090827	50,2649	4,18096	La Hante	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7284	MO-04465		49,65342149	4,856005112	Bar	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7285	MO-04465		49,65342149	4,856005112	Bar	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7286	MO-04465		49,65342149	4,856005112	Bar	Florent Lamand	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7287	MO-04342	20120726	50,1886	4,07824	R. de l'Ecrevisse	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7288	MO-01912	20120726	50,2649	4,18096	La Hante	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7289	MO-04342		50,1886	4,07824	R. de l'Ecrevisse	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7290	MO-04464		46,24907103	3,195975346	Meuse	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7291	MO-01945	20120726	48,9503	5,50256	Meuse	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7292	MO-01945	20120726	48,9503	5,50256	Meuse	Xavier Cucherat	<i>Unio crassus crassus</i>
IM	2013	7293	MO-000310	201207	47,01706183	0,563052818	Vienne	Vincent Prié	<i>Unio crassus courtillieri</i>
IM	2013	17779	MO-001487		49,3072	1,11065	Eure	Xavier Cucherat	<i>Corbicula fluminea</i>
IM	2013	17780	MO-001487	20110705	49,3072	1,11065	Eure	Xavier Cucherat	<i>Corbicula fluminea</i>
IM	2013	17781	MO-04462	2012	48,45975777	-5,081035977	Ouessant	Laurent Philippe	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12632	MO-001671	20111111	49,9093	2,62112	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12633	MO-001672	20111111	49,9495	2,84172	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12634	MO-001673	20111111	49,9084	2,61708	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12635	MO-001674	20111111	49,9083	2,61663	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12636	MO-001675	20111112	49,9476	2,87564	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12637	MO-001641	20111111	49,9499	2,84749	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12638	MO-001715	20110709	49,9283	2,75581	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12639	MO-001716	20110709	49,9283	2,75581	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12640	MO-001717	20110709	49,9243	2,75054	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12641	MO-001718	20110709	49,9242	2,7504	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12642	MO-001740	20110709	49,9127	2,7058	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12643	MO-001741	20110709	49,9127	2,7058	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12644	MO-001742	20110709	49,9127	2,7058	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>

IM	2013	12645	MO-001743	20110709	49,9123	2,70241	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12646	MO-001744	20110709	49,9123	2,70241	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12647	MO-001745	20110709	49,9136	2,69874	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12648	MO-001746	20110709	49,9136	2,69874	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12649	MO-001747	20120830	49,9136	2,69874	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12650	MO-001748	20120830	49,9138	2,69832	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12651	MO-001749	20120830	49,9161	2,69419	Somme	V. Prié	<i>Anodonta sp.</i>
IM	2013	12652	MO-04461	201307	49,91645932	2,501755384	Somme	Panier ?	<i>Anodonta cygnea ?</i>
IM	2009	17777	MO-04467	201307	43,5376402	2,677267293	Arn	V. Prié	<i>Margaritifera margaritifera</i>
IM	2009	17778	MO-04467	201307	43,5376402	2,677267293	Arn	V. Prié	<i>Margaritifera margaritifera</i>

Annexe II : séquences disponibles et séquences produites

Naïades	COI	16S	28S
Séquences disponibles (Espagne, Portugal, Suède, Maroc, Tunisie)	86	86	0
Séquences produites (France, Italie, Espagne)	230	271	248

Gastéropodes stygobies	COI	16S	28S
Séquences disponibles (France, Allemagne)	24	1	0
Séquences produites (France)	23	22	26

(voir détail pages suivantes)

Dark side of the earth: cryptic species in cryptic places challenge alpha-diversity assessments.

Frontiers in zoology, Prié, V., Bouchet, P. & Puillandre, N. *in prep.*

Specimen list, voucher numbers and GenBank accession numbers

Species proposed name	Location	Species name (when mined from GenBank) or locality	Specimen number	Specimen number			GenBank accession number	
				COI	16S	28S	16S	28S
<i>Bythiospeum busmanni</i>	Germany: Wickede im Ruhrtal	<i>busmanni</i>		HM107134				
<i>Bythiospeum acutum</i>	Germany: Heubach, Teufelsklingen Broeller	<i>acutum</i>		HM107121				
	Germany: Heubach, Teufelsklingen Broeller	<i>acutum</i>		HM107120				
	Germany: Heubach, Teufelsklingen Broeller	<i>acutum</i>		HM107119				
	Germany: Braunsbach, Wasserfraale	sp.		HM107127				
	Germany: Braunsbach, Wasserfraale	sp.		HM107126				
	Germany: Muehlheim an der Donau, Wulfbachquellhoehle	<i>saxigenum</i>		HM107125				
	Germany: Horb am Neckar, Diessen, Haugensteinmuehle	<i>suevicum</i>		HM107118				
	Germany: Horb am Neckar, Diessen, Haugensteinmuehle	<i>suevicum</i>		HM107117				
	Germany: Horb am Neckar, Diessen, Haugensteinmuehle	<i>suevicum</i>		HM107116				
	Germany: Garbenstetten, Falkensteiner Hoehle	<i>quenstedti</i>		HM107115				
	Germany: Garbenstetten, Falkensteiner Hoehle	<i>quenstedti</i>		HM107114				
	Germany: Garbenstetten, Falkensteiner Hoehle	<i>quenstedti</i>		HM107113				
	<i>Bythiospeum cf. francomontanum</i>	Switzerland: Soubey, Source de Cote au Bouvier	<i>francomontanum</i>		HM107131			
Switzerland: Soubey, Source de Cote au Bouvier		<i>francomontanum</i>		HM107130				
<i>Bythiospeum francomontanum</i>	Switzerland: Cormoret, Source de la Raisette	<i>francomontanum</i>		HM107133				
	Switzerland: Cormoret, Source de la Raisette	<i>francomontanum</i>		HM107132				
	Switzerland: Neuchatel, Source de la Serriere	<i>francomontanum</i>		HM107129				
	Switzerland: Neuchatel, Source de la Serriere	<i>francomontanum</i>		HM107128				
	Germany: Wendlingen am Neckar, Schaeferhausen	<i>pellucidum</i>		HM107124				
	Germany: Wendlingen am Neckar, Schaeferhausen	<i>pellucidum</i>		HM107123				
	Germany: Wendlingen am Neckar, Schaeferhausen	<i>pellucidum</i>		HM107122				
<i>Bythiospeum bourguignati</i>	France : Cadoule	8	B37	(1)				
	France : Cadoule	8	B34	(1)			(1)	
<i>Bythiospeum gargoii n.sp.</i>	France : Crès	5	B158		(1)			
	France : Crès	5	B160		(1)			
	France : Crès	5	B162	(1)				
	France : Crès	5	B165	(1)				
<i>Bythiospeum fontanei n.sp.</i>	France : Sauve	9	B2042	(1)	(1)		(1)	
	France : Sauve	9	B2044	(1)	(1)		(1)	
	France : Sauve	9	B2043	(1)	(1)		(1)	
<i>Bythiospeum articense</i>	France : Nizon	12	B190		(1)			
	France : Nizon	12	B191		(1)			
	France : Nizon	12	B192	(1)			(1)	
	France : Nizon	12	B193	(1)			(1)	
	France : Nizon	12	(Wilke et	AF367634				

			al.)			
<i>Bythiospeum roselloi</i>	France : Baume Sanilhac	11	Prosel2056	(1)		
<i>Paladilbia geniezji n.sp.</i>	France : Sauve	9	P8		(1)	
	France : Sauve	9	P11		(1)	
	France : Sauve	9	P12		(1)	(1)
	France : Sauve	9	P14		(1)	
	France : Sauve	9	P17			(1)
	France : Sauve	9	P18			(1)
	France : Sauve	9	P22		(1)	
	France : Sauve	9	P24	(1)		(1)
	France : Sauve	9	P25	(1)		
	France : Sauve	9	P15	(1)		(1)
	France : Sauve	9	P16	(1)		(1)
	France : Sauve	9	P20	(1)		(1)
	<i>Paladilbia umbilicata</i>	France : Trabuc	10	P68		(1)
France : Trabuc		10	P93		(1)	(1)
France : Trabuc		10	P96	(1)		
France : Trabuc		10	P97	(1)		
France : Trabuc		10	P98	(1)	(1)	
<i>Paladilbia pleurotoma</i>	France : Lez	6	P2024	(1)	(1)	(1)
	France : Lez	6	P2025	(1)	(1)	(1)
<i>Paladilbia martini n.sp.</i>	France : Fontenilles	4	P2066		(1)	(1)
	France : Fontenilles	4	P2067		(1)	(1)
<i>Moitessieria rolandiana</i>	France : Gour Noir	7	M2010	(1)	(1)	
	France : Gour Noir	7	M2012	(1)		
<i>Moitessieria tillierae n.sp.</i>	France : Vis	2	M149	(1)	(1)	
<i>Moitessieria vasseuri n.sp.</i>	France : Sauve	9	M31			(1)
	France : Cabrier	3	M2001			(1)
	France : Cabrier	3	M2002			(1)
<i>Moitessieria girardii n.sp.</i>	France : Gloriette	1	M1320			(1)
	France : Gloriette	1	M1321		(1)	(1)
	France : Gloriette	1	M1322			(1)
	France : Gloriette	1	M2037			(1)
<i>S. puteana</i>	France : La Prouesse	13		AF367635	EU573992	

(1) : GeneBank accession numbers coming soon.

Résumé

A l'âge de la 6^e extinction, il y a un besoin urgent pour les acteurs de la conservation et pour les biologistes de terrain de pouvoir s'appuyer sur une taxonomie qui soit opérationnelle, à la fois dans les méthodes (expertise taxonomique) et dans les concepts (listes de références). Dans ce travail, je teste l'hypothèse selon laquelle le contexte d'insularité continentale produit par la structure des aquifères, quel qu'en soit l'échelle, favoriserait l'émergence d'unités évolutives distinctes. Cette hypothèse est testée en étudiant deux modèles, les bivalves à l'échelle de la France métropolitaine et les gastéropodes stygobies à l'échelle des systèmes karstiques du nord-montpelliérain. Pour cela, une approche de taxonomie opérationnelle est développée pour les deux modèles, dans l'optique de permettre leur prise en compte effective dans les mesures de conservation.

Pour ces deux groupes à la taxonomie instable, des approches morphométriques, génétiques et biogéographiques sont développées, dans un cadre de taxonomie intégrative. Les données génétiques inédites permettent de clarifier la taxonomie et apportent un nouveau regard sur les unités de gestion existantes. Les résultats pour les naïades indiquent que la diversité est surévaluée et que les barrières géographiques jouent un faible rôle dans la distribution des taxons, laquelle semble essentiellement liée aux variables environnementales. Pour les gastéropodes stygobies au contraire, la diversité est largement sous-estimée et les unités évolutives sont liées aux unités hydrogéologiques. Les variables environnementales ne semblent pas influencer la répartition des taxons.

Ces résultats contrastés montrent que la diversité se structure différemment selon le groupe taxonomique et l'échelle géographique considérés, et posent la question de l'impact qu'auraient pu avoir les activités humaines sur la distribution des naïades. Les politiques de conservations doivent donc intégrer ces approches de taxonomie intégrative pour (i) définir correctement les unités biologiques qui doivent bénéficier d'efforts de conservation et (ii) mettre en place ces mesures à une échelle géographique adaptée.

Abstract

At the age of the 6th extinction, there is an urgent need for conservation stakeholders and field biologists of an operational taxonomy, both for methods (taxonomic expertise) and concepts (checklists). In this work, I test the hypothesis that continental insularity, linked to the structure of the aquifers, whatever the considered scale, leads to the divergence of distinct evolutionary units. This hypothesis is tested by studying two models, the freshwater bivalves at the scale of France and the stygobite gastropods at the scale of the north-Montpellier karstic system. To achieve this, an operational taxonomy approach is developed for these two models, in order to allow setting up effective conservation measures.

For these two groups characterized by an unstable taxonomy, morphometric, genetic and biogeographic approaches are developed, in an integrative taxonomy framework. New genetic data allow clarifying the taxonomy and provide a new perspective on the existing conservation units. For the naiads, the results indicate that diversity is overestimated and that geographical barriers play a minor role in distribution of the taxa, which seem to be linked to environmental parameters. On the contrary, the diversity of the stygobite gastropods is largely underestimated and evolutionary units are linked to the hydrogeological units. Environmental variables do not seem to influence the distribution of these species.

These contrasted results show that the structure of the diversity differs depending on the taxonomic group and the geographic scale considered, and raise the question of the impact of human activities on the distribution of the naiads. Conservation politics should take into account these integrative taxonomy approaches to (i) define adequately the biological units that should benefit from conservation efforts and (ii) set up these measures at an adequate geographic scale.