



HAL
open science

Taxonomie, Phylogénie et Dispersion du genre *Eleotris* (Teleostei: Gobioidae: Eleotridae) dans l'Indo-Pacifique

Marion Mennesson

► **To cite this version:**

Marion Mennesson. Taxonomie, Phylogénie et Dispersion du genre *Eleotris* (Teleostei: Gobioidae: Eleotridae) dans l'Indo-Pacifique. Evolution [q-bio.PE]. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2016. Français. NNT: 2016MNHN0002 . tel-04773998

HAL Id: tel-04773998

<https://theses.hal.science/tel-04773998v1>

Submitted on 8 Nov 2024

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 2016

N° attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□□□

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : Ecologie et Evolution

Présentée et soutenue publiquement par

Marion Mennesson

Le 07 décembre 2016

**TAXONOMIE, PHYLOGENIE ET DISPERSION DU GENRE
ELEOTRIS (TELEOSTEI: GOBIOIDEI: ELEOTRIDAE) DANS
L'INDO-PACIFIQUE**

Sous la direction de : **Professeur Philippe Keith & Professeur Eric Feunteun**

JURY :

M. Brito Paulo	Professeur, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brésil	Rapporteur
M. Gerbeaux Philippe	Senior Conservation Officer, Departement of Conservation, Nouvelle-Zélande	Rapporteur
Mme Iida Midori	Assistante Professeur, Faculty of Science, Niigata University, Japon	Examinatrice
Mme Lord-Daunay	Maître de Conférence, Université de Pierre et Marie Curie (UPMC), Paris	Examinatrice
M. Le Bail Pierre-Yves	Directeur de Recherche, Institut National de Recherche Agronome (INRA), Rennes	Examinateur
M. Keith Philippe	Professeur, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris	Directeur de thèse
M. Feunteun Eric	Professeur, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris	Directeur de thèse

Remerciements

Je commencerai mes remerciements par cette citation de Victor Hugo « *la persévérance est au courage ce que la roue est au levier, c'est le renouvellement perpétuel du point d'appui* » (Les travailleurs de la mer, 1866).

Pourquoi cette phrase me direz-vous ? Pour la simple et bonne raison que mon aventure au sein de l'équipe a tout d'abord commencé par des envois successifs de mails au **Pr. Philippe Keith**, alors que je n'étais qu'en 1^{ère} année de master, expliquant que je voulais à tout prix effectuer un stage au sein de son équipe mais que ce dernier ne pouvait que me proposer un stage pour l'année d'après, à savoir pour mon année de master 2. J'ai donc dû faire preuve de patience mais aussi de persévérance afin que le Pr. Keith ne m'oublie pas et qu'il sache que j'étais plus que motivée pour travailler avec lui. Et c'est ainsi, qu'en janvier 2012 je débutais mon aventure au sein de l'équipe 4 de l'UMR BOREA pour un stage de 6 mois en otolithométrie. Une fois mon diplôme de Master 2 en poche, je me suis retrouvée face à cette situation, que connaît un grand nombre de jeunes diplômés, l'arrivée sur « le marché du travail ». C'est un milieu hostile où les personnes ayant mon parcours ne trouvent pas leur place et où beaucoup de nos rêves s'effondrent lorsqu'au Pôle Emploi, on vous met dans la catégorie des personnes travaillant dans le milieu de l'ingénierie dans l'environnement (à savoir les panneaux solaires dans mon cas ☺). Voyant mon désarroi, Philippe m'a obtenu un travail de courte durée (mais très intéressant) en otolithométrie sur une espèce amazonienne du genre *Brachyplatystoma* avec Marc Pouilly de l'IRD et je le remercie de m'avoir donné cette opportunité. Il m'a aussi encouragée à réaliser un DU-IP (Diplôme Universitaire d'Insertion Professionnelle) afin d'acquérir de nouvelles compétences et ce, par le biais de la générosité de la SFI (Société Française d'Ichtyologie), que je me permets aussi de remercier très chaleureusement. C'est grâce à toutes ces opportunités que j'ai réellement développé ma passion pour la recherche et que, pour la première fois dans mon cursus, je me suis dit « je veux faire une thèse et faire de la recherche ».

Depuis la fin de mon master 2, **Philippe** n'a cessé de se démener pour me trouver une place et du travail au sein de son équipe et pour cela, je lui serais **éternellement reconnaissante**. C'est ainsi qu'au fil des années, Philippe est devenu mon « *point d'appui* » sans qui mon aventure aurait touché à sa fin dès la fin de mon stage en 2012. Cependant, pour ceux qui me connaissent, vous vous doutez bien que Philippe a dû, de temps à autres, regretter de m'avoir prise sous son aile ; Ah bah oui, les phrases telles que « Phiiiiipe, j'ai un problème » ou alors « non mais, ils se foutent de ma gu**le ces reviewers » auront je pense, marquées Philippe à vie ! [rires]. Toutefois, il a su canaliser et apaiser mes moments d'angoisse, de déception et de colère. Et je sais que ce n'est pas chose facile avec mon caractère qui peut démarrer au quart de tour.

Tout ce 1^{er} paragraphe t'est donc destiné Philippe car sans toi, je n'en serais pas là où j'en suis maintenant et jamais je n'aurais pu découvrir le monde merveilleux des Eleotridae, (oui, je ne mets pas les Gobiidae car c'est trop superflue et ils sont trop colorés ceux-là [rires]), et plus précisément, des *Eleotris*. Ce ne sont pas les plus beaux poissons des îles mais on s'y attache vite et surtout, ils captivent tant au niveau de la taxonomie que de leur histoire évolutive !

Bien entendu, je tiens aussi à remercier tout particulièrement **Éric Feunteun** dit « Teun-Teun » pour toute sa générosité et sa confiance concernant la partie portant sur *Anguilla marmorata* qui malheureusement ne fera pas partie de cette thèse mais qui donnera lieu à de nouveaux projets tous plus intéressants les uns que les autres. Les anguilles ne cesseront jamais de nous fasciner et de nous étonner ! Grâce à toi, j'ai pu apprendre le fonctionnement du NanoSIMS du MNHN avec lequel j'ai eu du fil à retordre. Mais avec les anguilles, on l'a bien compris, c'est la persévérance qui prime !

Un grand merci à **Anthony Acou** et **Alexandre Carpentier** pour leur aide concernant ce volet « anguilles ».

Je souhaite remercier les membres du jury **Midori Iida**, **Lord-Daunay Clara**, **Paulo Brito**, **Philippe Gerbeaux** et **Pierre-Yves Le Bail** qui ont accepté de juger mon travail et pour le temps et l'attention qu'ils ont consacrés à la lecture et l'examen de mon manuscrit.

Je remercie **Guy Duhamel** de m'avoir accueillie au sein du Département Milieux et Peuplements Aquatiques (DMPA) ; et aussi d'avoir toléré mes petites « gueulantes » du matin qui étaient souvent liées aux transports en commun. Mais aussi **Sylvie Dufour** pour m'avoir acceptée au sein de l'UMR BOREA pour que je puisse y préparer ma thèse, et incontestablement, je remercie encore mes deux directeurs de thèse, **Philippe Keith** et **Éric Feunteun** pour m'avoir fait confiance durant ces 3 ans de recherche passionnants.

Je remercie également **Marie-Catherine Boisselier** et **Eric Pasquet** pour avoir accepté que je réalise mes manipulations de génétique au sein du Service de Systématique Moléculaire (SSM). Toute ma gratitude va à l'équipe du SSM et en particulier, à **Céline Bonillo** et **Josie Lambourdière** qui m'ont grandement aidée notamment lorsque le robot d'extraction ADN faisait des siennes ! Mais aussi à **Delphine Gey** et **Régis Debruyne** qui sont toujours prêts à aider et rendre service.

Je tiens aussi à remercier **Claude Ferrara** pour son aide lors de la photographie des post-larves, sans lui mes photos seraient de mauvaise qualité, et bien entendu **Nalani Schnell** pour la réalisation des radiographies de mes spécimens.

Mes années de thèse passées au sein du labo n'auraient jamais pu être ce qu'elles étaient sans un certain nombre de personnes qui ont largement contribué à ma bonne humeur et à attiser ma curiosité (tant sur le point intellectuel que sur les commérages, ah

oui ! Je suis une fille [rires]). Je commencerai donc ces remerciements en suivant mes horaires quotidiens ; à savoir par Corinne Guchereau et François Menier ! Ah, nos petites conversations du début de journée entre 8h et 8h15 vont me manquer ... Grâce à toi **François**, j'ai pu apprendre un certain nombre de choses (dont la lecture des vertèbres) et j'ai toujours adoré quand tu avais une anecdote à raconter. Quant à toi **Coco**, tu es une personne en or ! Personne ne pourra te remplacer ; tes petits gâteaux ainsi que nos petits moments de commérages me manqueront beaucoup. Je passe ensuite à **Mélyne**, ou plus communément appelée Mémé, avec qui on partage une même passion : « râler » et, dire des gros mots [rires]. Concernant le premier point, nous sommes à égalité mais ce serait mentir que de dire que je ne te bats pas sur le second. Mais nous avons partagé d'autres choses et oui ! N'oublions pas les problèmes dans la salle de sclérochronologie auxquels nous avons dû faire face : problème de tronçonneuse, logiciel qui ne fonctionne pas, caméra plus du tout calibrée ... Un petit mot pour le SAV de chez Olympus ? [rires]. Vient ensuite le tour de **Laure**, ma copine de mal de genou ☺ ou pour les intimes « ti'pa'd'bol » ! Ça va me manquer tous nos fous rires et nos petites conversations. En tout cas, grâce à toi, j'ai beaucoup muri dans ma façon de voir, de comprendre et de traiter mes données moléculaires. La réalisation des arbres phylogénétiques avec MrBayes n'ont plus (enfin presque plus) de secret pour moi ! Tu m'as beaucoup apporté durant mes deux dernières années de thèse et je t'en suis vraiment reconnaissante. Continuons dans la lignée des « copines - collègues » avec **Clara** ou Clarounette ; merci pour ton soutien quotidien que tu m'as prodigué depuis mon stage de DU-IP. Tu es en quelque sorte (comme tu le dis si bien) ma maman de labo ☺ et, tu n'as pas hésité à m'accueillir chez toi quand j'en ai eu besoin et pour cela aussi je te suis très reconnaissante ; j'en ai même profité pour me faire une nouvelle copine, ta poupette Eloïse, et rencontrer « Lapin ». Mais non Pada, je ne t'ai pas oublié ! Oui, je suis bien en train de parler de mon « colloc'-collègue-ami » de bureau : **Gaël** ! Ah mon pauvre, peut-être qu'à ce jour tu regrettes de m'avoir proposé de venir partager ton bureau !? Non ? De toutes manières sans moi le bureau serait sans vie et triste ☺ En tous cas, je te remercie mille fois de m'avoir supportée tout au long de ces trois années, et surtout de m'avoir appris plein de choses concernant la nomenclature – taxonomie qui sont loin d'être faciles à comprendre lorsque l'on ne vient pas d'un cursus spécialisé en systématique ! Bien entendu, je n'oublie pas **Agnès** pour toute son aide sur la partie génétique et je peux dire que j'ai été fière d'être l'une de tes PME (« Pas Mon Etudiant ») et **Hélène** qui m'a tant appris sur les mystères que renferment les otolithes ! Et je remercie tous mes autres collègues, Charlotte, Lina, Zora, Jocelyne, Philippe, Fréd, Alexis, Patrice, les deux Nicolas, les deux Romain, Ahmed et **Gérard** (avec qui j'ai découvert le Vanuatu). Mais aussi, **Céline**, **Fabienne** et **Chloé** avec qui j'apprécie papoter et commérer, mes collègues doctorants **Valentin** et **Carole**, et les stagiaires de Master, Sophie, Mathilde et Baptiste.

En sortant du bac, mon grand-père maternel n'arrêtait pas de me dire qu'il fallait que je fasse du droit ; on est bien loin de ce domaine aujourd'hui. Etre la seule biologiste de la **famille** n'est pas une mince à faire mais tout le monde a su me soutenir, chacun à

leur façon. Les personnes qui m'ont incontestablement soutenue depuis le début ne sont autres que mes parents. Je souhaite à n'importe qui d'avoir des **parents** en or comme les miens. Le plus difficile avec son entourage non scientifique c'est qu'il faut toujours vulgariser ce que l'on fait et ça, c'est un sacré exercice ! Parlons maintenant de mes amis, ma meilleure amie, **Auré**, pour qui la biologie et l'anglais ne sont pas sa tasse de thé mais qui a toujours été à mon écoute. L'adage qui dit « loin des yeux, loin du cœur » ne nous concerne pas, une amitié comme la nôtre ne se brise pas si facilement ! Et bien entendu, merci à toi, **Mag'** pour tous ces bons moments quand je passe vous voir dans votre beau et chaud Sud-Ouest, « vive les réac. ! » Je tiens à remercier les Camilles bien sûr, **Millou**, **CamCam** et **Cam**, avec qui j'ai passé la plupart de mes week-end et qui m'ont permis (même sans s'en rendre compte) de me détendre et de penser à autre chose qu'au boulot. Je remercie aussi **Margot**, avec qui je partage une amitié sincère depuis la seconde ; et **Flora**, ma seule amie biologiste pour qui au moins je ne parle pas chinois quand j'emploie le jargon du métier ☺ Et pour finir, je tiens à dire un grand merci à toute la bande de potes : **Laura**, **Jessica**, **Fanny**, **Dounia**, **Ulysse**, **Pierre**, **Julien**, **Simon**, et **Arnaud** avec qui j'oublie tous mes soucis et mes tracas du quotidien.

Oui je sais, mes remerciements font 4 pages et alors ?

Ce n'est pas tous les jours qu'on écrit une thèse ...

A mes grands-pères partis trop tôt,
ma famille & mes parents.

SOMMAIRE

Introduction	1
<hr/>	
I. Une zone d'étude très étendue : la région Indo-Pacifique et ses milieux insulaires	2
1. La région Indo-Pacifique.....	2
a. Le Triangle de Corail, le plus grand hotspot de biodiversité.....	3
b. Climat, Courants océaniques et dispersion des espèces.....	7
c. Les rivières insulaires, notre écosystème d'étude dans l'Indo-Pacifique.....	15
2. Géologie des fonds marins.....	16
a. Formation des îles.....	16
b. Expansion verticale et horizontale des fonds océaniques.....	18
II. La diadromie : cycle de vie clé dans la colonisation des milieux dulçaquicoles des îles tropicales et subtropicales	22
1. Emergence des milieux dulçaquicoles.....	22
2. Stratégie de colonisation : la diadromie.....	23
3. Impacts des activités anthropiques sur les milieux d'eau douce	26
III. Modèle d'étude : le genre <i>Eleotris</i>	29
1. Ecologie du genre.....	29
2. Complexité du genre – concept d'espèce – taxonomie.....	35
IV. Contexte et objectifs de la thèse	37
Chapitre 1 : Méthodologie	39
<hr/>	
I. Stratégie d'échantillonnage	40
II. Protocole d'identification des espèces d'<i>Eleotris</i> sur le terrain	43

III. Otolithométrie	45
1. Les otolithes : la « boîte noire » des Téléostéens.....	45
a. La sclérochronologie.....	45
b. Position anatomique des otolithes.....	46
c. Fonction et composition des otolithes.....	46
d. Lien entre les ratios élémentaires et l'amphidromie.....	49
2. Estimation de la durée de la phase larvaire.....	50
a. Extraction des otolithes.....	50
b. Inclusion des otolithes.....	51
c. Ponçage.....	52
d. Estimation de la durée de la phase larvaire.....	53
e. Validation microchimique de la phase larvaire marine et de l'amphidromie.....	55
IV. Analyses moléculaires	56
1. Avant-propos : Evolution des techniques de séquençage moléculaire.....	56
2. Les marqueurs moléculaires utilisés.....	57
a. Le marqueur mitochondrial « classique » : le gène <i>COI</i>	58
b. Le gène de la rhodopsine (<i>Rh</i>).....	59
c. Le génome mitochondrial complet : mtDNA.....	59
3. Extraction de l'ADN.....	60
4. Amplification des fragments de gène et/ou d'un gène entier à partir de l'ADN génomique total.....	61
a. Amplification des fragments courts : gènes <i>COI</i> et <i>Rh</i>	61
b. Amplification du mitogénome complet.....	62
5. Le séquençage.....	64
a. Pour la méthode « Sanger ».....	64
b. Pour la méthode « NGS ».....	64
6. Vérification, nettoyage et alignement des séquences.....	69
a. Pour la méthode « Sanger ».....	69
b. Pour la méthode « NGS ».....	69
7. Résumé du jeu de données moléculaire obtenu.....	71

8. Reconstruction phylogénétique par inférence bayésienne.....	72
9. Etude de la phylogéographie des espèces.....	76
a. Avant-propos : les principes d'une étude phylogéographique.....	76
b. Analyse de la structure spatiale des populations.....	76
c. Analyses multivariées de la structuration génétique des populations.....	77
d. Test de neutralité sélective et d'équilibre des populations.....	78

Chapitre 2 : Bilan taxonomique du genre *Eleotris* 79

I. Rappel, taxonomie et Code de nomenclature	80
II. Rappel sur l'état actuel des espèces valides d'<i>Eleotris</i> de l'Indo-Pacifique et recherche des types dans les collections muséales	83
III. Etude morpho-méristique du genre <i>Eleotris</i> de l'Indo-Pacifique	86
1. Spécimens adultes.....	86
a. Les papilles sensorielles céphaliques.....	87
b. Les critères morpho-méristiques.....	89
2. Post-larves.....	90
a. Distinction en fonction de la pigmentation du corps.....	91
b. Distinction en fonction de la taille.....	97
V. Révision taxonomique du genre <i>Eleotris</i> dans l'Indo-Pacifique	98
1. Identification à partir des papilles sensorielles.....	98
2. Résultats de l'identification à partir des critères morpho-méristiques.....	99
a. Combinaison « fermé ; 2.4.6 ».....	99
b. Combinaison « fermé ; 2.3.4 ».....	108
c. Combinaison « fermé ; 2.4.5.6 ».....	113
d. Combinaison « ouvert ; 2.4 ».....	116
e. Combinaison « ouvert ; 2 ».....	122
VI. Nouvelle liste des espèces valides du genre <i>Eleotris</i> de l'Indo-Pacifique	124

**Chapitre 3 : Description d'une espèce d'*Eleotris* endémique des îles
Salomon : *E. bosetoi* 131**

Article 1: *Eleotris bosetoi* (Teleostei: Gobioidae: Eleotridae), a New Species of freshwater
fish from the Solomon Islands

Introduction	134
I. Materials & methods	136
1. Material.....	136
2. DNA analyses.....	136
3. Morpho-meristic.....	137
II. Results & discussion	138
1. Genetic results.....	138
2. Description of the new species.....	141
3. Material examined.....	141
4. Diagnosis.....	141
5. Description.....	143
6. Colour in life.....	147
7. Colour in preservation.....	148
8. Comparison.....	148
9. Distribution.....	148
10. Ecology.....	148
11. Etymology.....	149
12. Comparative material.....	149
Conclusion	152

Chapitre 4 : Phylogénie des *Eleotris* de l'Indo-Pacifique 153

Introduction	154
I. Matériel & Méthodes	154
1. Espèces incluses dans l'analyse génétique.....	154
2. Extraction et amplification de l'ADN.....	156
a. Extraction de l'ADN.....	156
b. Amplification d'un fragment du gène <i>COI</i>	157
c. Amplification du mitogénome complet.....	158
3. Vérification, nettoyage et alignement des séquences.....	158
a. Fragment du gène <i>COI</i>	158
b. Mitogénome complet, mtDNA.....	159
II. Résultats	161
1. 1 ^{ère} phylogénie obtenue à partir d'un fragment du gène <i>COI</i> (585 pb).....	161
2. 2 ^{ème} phylogénie obtenue à partir du mitogénome partiel (7143 pb).....	164
a. Approche moléculaire.....	164
b. Morphologie vs. Phylogénie.....	165
III. Discussion & Conclusion	168

Chapitre 5 : Etude de la phylogéographie d'*E. fusca* et comparaison avec *E. acanthopoma* 177

Partie I.

Article 2: Phylogeography of *Eleotris fusca* (Teleostei: Gobioidae: Eleotridae) in the Indo-Pacific area reveals a cryptic species in the Indian Ocean

Introduction	180
I. Materials & methods	182
1. Sample collections.....	182

2.	DNA extraction and amplification.....	182
a.	<i>COI</i> gene.....	182
b.	Complete mitogénome and <i>Rh</i> gene.....	184
3.	<i>COI</i> analysis.....	186
4.	Complete mtDNA and <i>Rh</i> gene analyses.....	188
II.	Results	193
1.	Gene diversity for mtDNA <i>COI</i>	193
2.	Phylogeographic analysis for mtDNA <i>COI</i>	193
3.	Phylogenetic analyses: complete mtDNA and <i>Rh</i> gene.....	195
III.	Discussion	196
1.	Pelagic larval duration vs. phylogeographic results.....	196
2.	<i>E. cf. fusca</i> , an endemic cryptic species of Indian Ocean.....	199
3.	<i>E. fusca</i> , a widespread species in the Indo-Pacific.....	200
	Conclusion	201
	Conclusion sur la Partie I	202

Partie II.

Comparaison de la phylogéographie de deux espèces à large répartition dans l'Indo-Pacifique : *E. fusca* et *E. acanthopoma*

I.	Matériel & Méthodes	203
1.	Jeu de données pour <i>E. fusca</i>	203
2.	Jeu de données pour <i>E. acanthopoma</i>	204
II.	Résultats & Discussion	205
	Conclusion générale	209

Chapitre 6 : Mise en évidence d'une espèce cryptique dans l'océan Indien et revalidation d'*E. klunzingerii* 210

Article 3: Molecular evidence of two species of the *Eleotris fusca* cephalic free neuromast pattern group (Teleostei: Gobioidae: Eleotridae) in the Indian Ocean

Introduction	213
I. Materials & methods	215
1. Material.....	215
2. DNA analysis.....	215
3. Morpho-meristic.....	216
II. Results & discussion	218
1. Genetic results.....	218
2. Morpho-meristic comparison.....	219
3. Revalidation of <i>Eleotris klunzingerii</i> Pfeffer 1893.....	221
4. Distribution.....	221
5. Material examined.....	222
6. Comparative material.....	223
Conclusion	226

Chapitre 7 : Etude de la dispersion larvaire chez *E. fusca* et *E. klunzingerii* 228

Préambule 229

Article 4: **Amphidromous life cycle of *Eleotris fusca* (Gobioidei: Eleotridae), a widespread species from the Indo-Pacific studied by otolith analyses**

Introduction 232

I. Materials & Methods 236

1. Sampling and measurement.....236

2. Otolith preparation and estimation of the PLD.....236

3. Microchemical analysis..... 238

4. Statistical analysis..... 239

II. Results 241

1. Otolith Sr:Ca ratios..... 241

2. PLD estimation..... 241

3. Otolith growth.....242

III. Discussion 242

1. Otolith Sr:Ca..... 242

2. Duration of the pelagic larval phase (PLD).....245

3. Otolith growth.....247

Conclusion 248

Conclusion sur l'étude otolithométrie 249

Synthèse et perspectives	251
<hr/>	
I. Les espèces du genre <i>Eleotris</i> , des espèces clés dans les systèmes insulaires	252
II. Une révision taxonomique du genre <i>Eleotris</i> était primordiale avant toute étude visant à analyser les traits d’histoire de vie d’un <i>Eleotris</i> en particulier	252
III. Génomique, taxonomie et évolution	254
IV. L’étude approfondie du complexe « <i>fusca</i> » permet de mettre en évidence la présence de barrières à la dispersion au sein de l’Indo-Pacifique et apporte de nouvelles perspectives quant à la dispersion larvaire en mer	255
V. Une nouvelle liste d’espèces d’ <i>Eleotris</i> dans la zone Indo-Pacifique pour de nouveaux plans de gestion et de conservation	260
Bibliographie	262
<hr/>	
Annexes	284
<hr/>	

Avant-propos

Cette thèse de doctorat a été financée par l'UMR BOREA 7208 avec de l'association AIMARA et la Société Française d'Ichtyologie (SFI).

Les travaux menés dans cette thèse ont été valorisés ou sont en cours de valorisation par des publications scientifiques et ont fait l'objet de communications orales et posters. J'ai aussi participé à l'encadrement d'étudiants.

Publications

Hinsinger D.D., Debruyne R., Thomas M., Denys G.P.J., Menesson M., Utge J., Dettai A. – **2015** – Fishing for barcoding in the Torrent: from COI to complete mitogenomes on NGS platforms. *DNA Barcodes*, 3: 170-186.

Menesson M.I., Tabouret H., Pécheyran C. Feunteun E., Keith P. – **2015** – Amphidromous life cycle of *Eleotris fusca* (Gobioidei: Eleotridae), a widespread species from the Indo-Pacific studied by otolith analysis. *Cybium*, 39: 249-260.

Menesson M.I., Keith P., Ebner B.C., Gerbeaux P. – **2016** – *Eleotris bosetoi* (Teleostei: Gobioidei: Eleotridae) a new species of freshwater fish from the Solomon Islands. *Pacific Science*, *in press*.

Publications soumises

Menesson M.I., Keith P. – Molecular evidence of two species of the *Eleotris fusca* cephalic free neuromast pattern group (Teleostei: Gobioidei: Eleotridae) in the Indian Ocean.

Menesson M.I., Bonillo C., Keith P. – Phylogeography of *Eleotris fusca* (Teleostei: Gobioidei: Eleotridae) in the Indo-Pacific area reveals a cryptic species in the Indian Ocean.

Communications orales

Menesson M.I., Feunteun E., Keith P. – **2014** – Diadromie, dispersion et histoire évolutive compare des genres *Eleotris-Anguilla* dans les systèmes insulaires. Journées Scientifiques de l'UMR BOREA 7208.

Menesson M.I., Feunteun E., Keith P. – **2015** – Les nouvelles techniques de séquençage (NGS) au service du travail d'équipe. Journées Scientifiques de l'UMR BOREA 7208.

Menesson M.I. & Keith P. – **2015** – Une espèce à large répartition peut en cacher une autre. Cas d'un Eleotridae amphidrome de l'Indo-Pacifique, *Eleotris fusca*. 6^{èmes} rencontres de l'Ichtyologie en France, Paris.

Menesson M.I., Feunteun E., Keith P. – **2016** – L'étude de la phylogéographie d'*Eleotris fusca* (Teleostei : Gobioidae : Eleotridae) dans l'Indo-Pacifique révèle une espèce cryptique dans l'océan Indien. Journées Scientifiques de l'UMR BOREA 7208.

Posters

Menesson M.I., Tabouret H., Pécheyran C. Feunteun E., Keith P. – **2015** – Migratory history and life cycle of *Eleotris fusca* (Teleostei: Gobioidae: Eleotridae) a widespread species from the Indo-Pacific studied by otolith analyses. The 39th Larval Fish Conference, Vienne (Autriche).

Bonillo C., Lambourdière J., Gey D., Denys G.J.P., Menesson M., Thomas M. Hinsinger D., Dettai A., Debryune R. – **2015** – Optimisation opérationnelle et économique du multiplexage en NGS par une approche de double parallélisation. 3^{ème} Colloque de Génomique Environnementale, Montpellier.

Rapport

Acou A., Kalfatak D., Marquet G. Menesson M. – **2014** – Freshwater fish & crustaceans of Epi and Gaua islands (Vanuatu) – MNHN – CEPF.

Encadrement

Septembre 2014 : J'ai initiée Thomas Maëva, bénévole, aux techniques de dissection, d'inclusion, de ponçage et de lecture de la microstructure des otolithes.

Avril-Mai 2015 : J'ai encadré Sophie Delastre, étudiante de Master 1 sur le sujet : « Etude de la dispersion larvaire chez une espèce amphidrome de l'Indo-Pacifique : *Eleotris fusca* ». Je l'ai formée aux techniques de dissection, d'inclusion, de ponçage et de lecture de la microstructure des otolithes.

Fonction élective

J'ai été représentante des doctorants au Conseil de l'UMR BOREA durant 2 ans (2014-2015).

Introduction

« Les degrés de dissemblance dépendent de ce que les migrations des formes organisées dominantes ont été plus ou moins efficacement effectuées à des époques plus ou moins reculées (...). C'est ainsi que les barrières, en mettant obstacle aux migrations, jouent un rôle important, tout comme le temps, dans le lent procès de modification par la sélection naturelle ».

« Les changements climatériques doivent avoir exercé une puissante influence sur les migrations ; une région, infranchissable aujourd'hui, peut avoir été une grande route de migration, lorsque son climat était différent de ce qu'il est actuellement. Les changements de niveau du sol ont dû aussi jouer un rôle important ; un isthme étroit sépare aujourd'hui deux faunes marines ; que cet isthme soit submergé ou qu'il l'ait été autrefois, et les deux faunes se mélangeront ou se seront déjà mélangées »

Charles Darwin, *L'origine des espèces*, 1859.

I. Une zone d'étude très étendue : la région Indo-Pacifique et ses milieux insulaires

1. La région Indo-Pacifique

L'union de l'océan Indien avec la mer Rouge, le golfe Persique et l'océan Pacifique constitue ce que l'on appelle la **région Indo-Pacifique**. Cette dernière représente la plus large région biogéographique du monde et comprend d'innombrables îles tropicales et subtropicales. Parmi toutes ces îles, un archipel ou plutôt une zone est connue pour être la source principale de la biodiversité mondiale : le **Triangle de Corail** (Veron et al. 2009) aussi nommé Archipel Indo-malais ou Archipel Indo-australien (Fig. 1). Cette région inclue un grand nombre d'îles du Pacifique Ouest : les Philippines, l'Indonésie, la Malaisie, la Papouasie Nouvelle-Guinée, les îles Salomon et le Timor-Leste ; soit plus de 1 million de km² *i.e.*, la moitié de la taille des Etats-Unis.

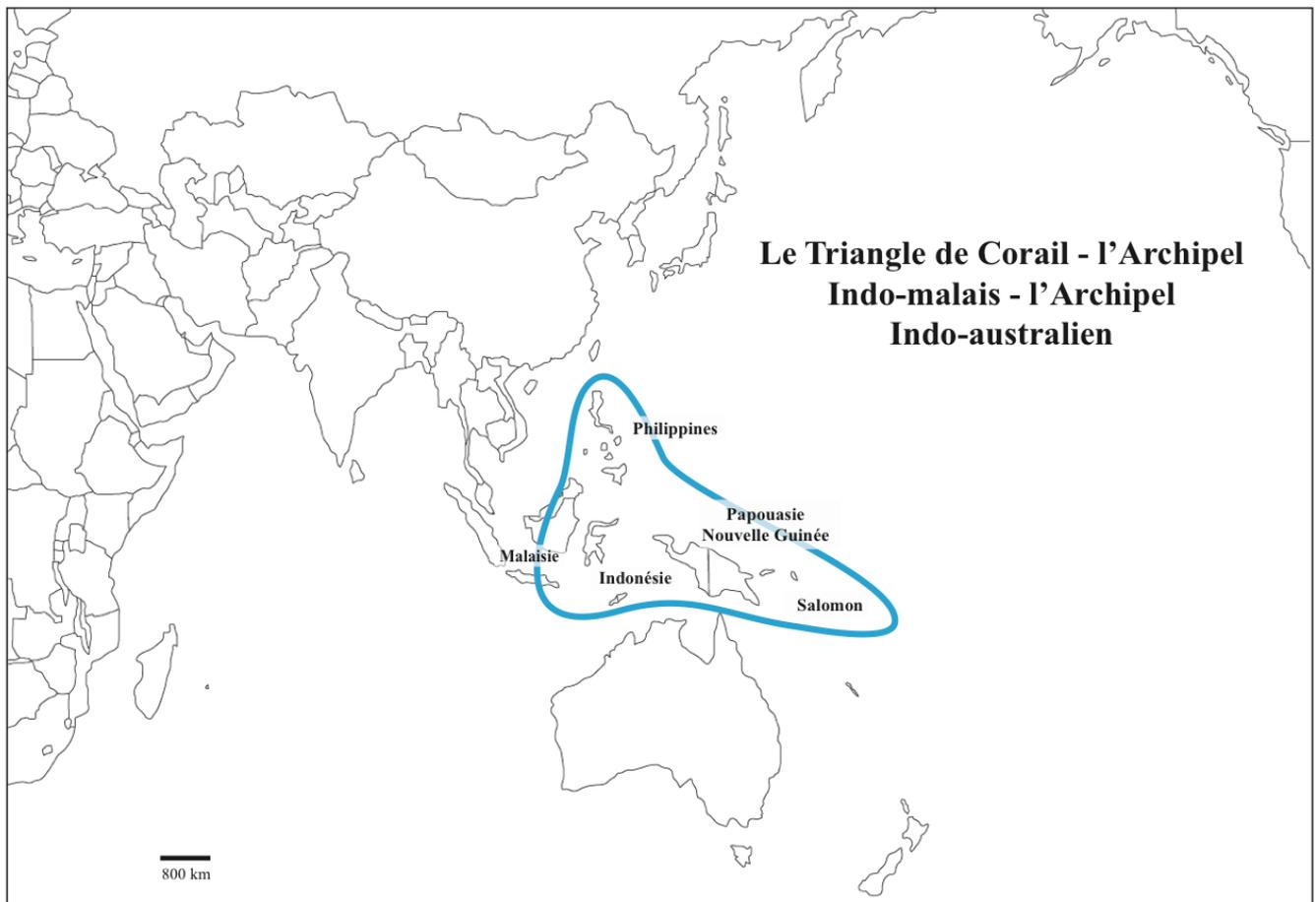


Figure 1 : Schématisation du Triangle de Corail (cercle bleu)

a. Le Triangle de Corail, le plus grand hotspot de biodiversité

De nombreux groupes de récifs coralliens atteignent leur plus haut taux de diversité dans le **Triangle de Corail (TC)** et, ceci a aussi été constaté pour d'autres taxons appartenant à des écosystèmes peu profonds (Fig. 2). Il a aussi été remarqué que cette diversité taxonomique diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne du TC (Mouillot et al. 2013, Leprieur et al. 2016).

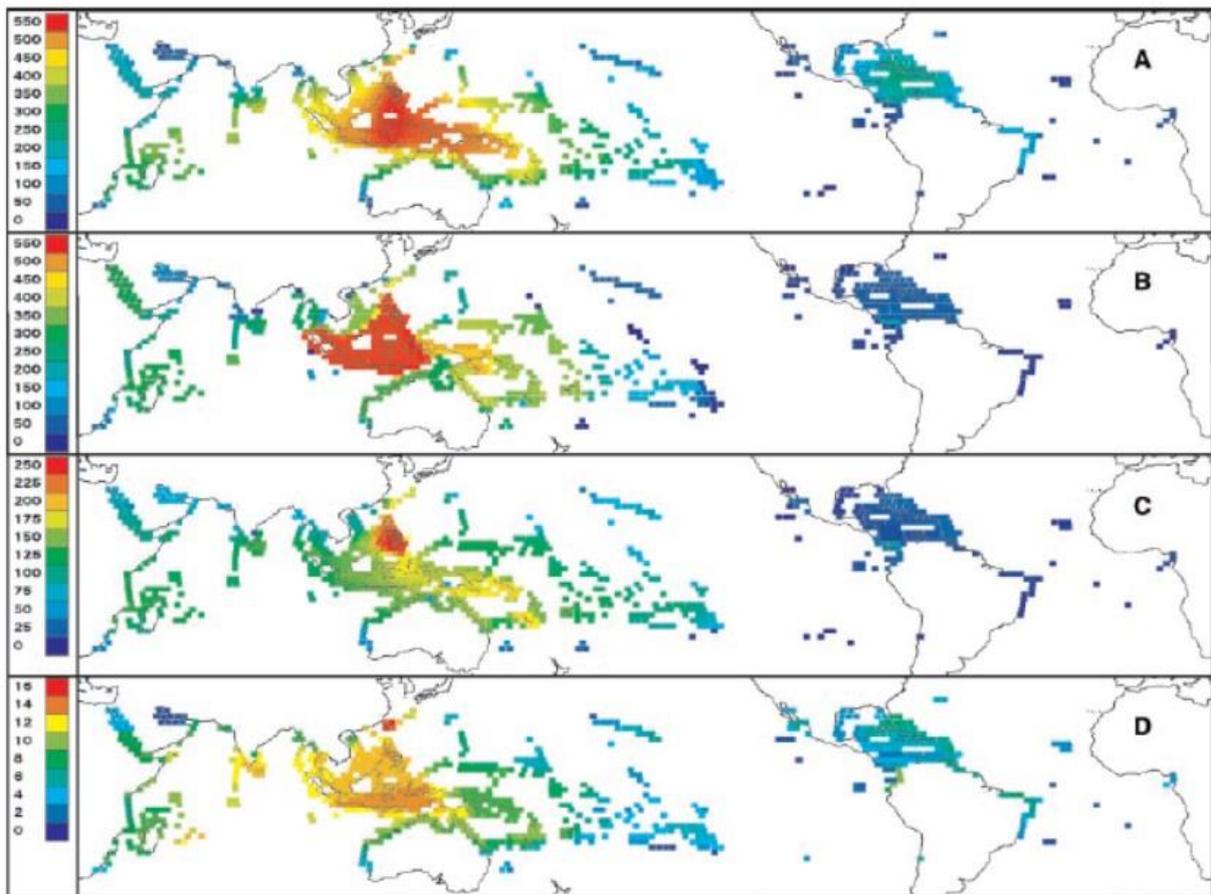


Figure 2 : Evolution de la richesse spécifique à l'échelle mondiale chez les poissons (A), les coraux (B), les escargots (C) et les homards (D). Les échelles montrent le nombre d'espèces présentes. (Modifié d'après Roberts et al. 2002)

Naissance du hotspot de biodiversité dans le Triangle de Corail

La Téthys était, au Crétacé, une immense étendue maritime qui séparait l'Afrique et l'Inde de l'Europe et de l'Asie (Fig. 3, A). Au cours du Crétacé et au début du Cénozoïque, cet océan s'est rétréci progressivement, et s'est finalement fermé complètement, formant ainsi une zone

de collision continentale qui a produit les Alpes et l'Himalaya. Cependant, du fait que la Téthys était plus étroite à l'Ouest qu'à l'Est, sa fermeture a eu lieu beaucoup plus tôt dans la partie occidentale que dans la partie orientale. En effet, les premiers stades de la collision se sont produits dans la région méditerranéenne au cours de l'Eocène et seulement au début du Miocène pour la région arabe. Et c'est à partir de l'Eocène que les premiers **points chauds (ou « hotspots ») biologiques** sont apparus (Fig. 3A). Suite à la déformation du plancher océanique et de l'agrégation de divers fragments de microcontinents, une large et dynamique étendue d'environnements marins peu profonds a vu le jour, permettant la formation d'une faune et d'une flore spécifique et augmentant ainsi la biodiversité. Malheureusement, à la fin des étapes de la collision continentale, la fermeture de l'océan et le soulèvement de la ceinture de montagnes oblige les espèces marines peu profondes à migrer ou alors seront poussées à l'extinction. Certaines espèces durent ainsi migrer de plus en plus vers l'Est, pour finir au niveau du **Triangle de Corail** (Fig. 3).

Ainsi, une grande partie de la diversification des faunes marines tropicales a commencé avant le Quaternaire, mettant en avant l'influence d'événements historiques anciens tels que le mouvement des plaques tectoniques. Les travaux de Renema et al. (2008) (Fig. 3) à partir de fossiles de foraminifères illustrent bien la migration du hotspot biologique à travers le globe durant les 50 derniers millions d'années ; partant de l'ouest de la Téthys durant l'Eocène (55-33 Ma), de la péninsule Arabique à l'ouest de l'océan Indien durant la fin de l'Eocène et l'Oligocène (37-15 Ma) et finissant au TC au Miocène (15-5 Ma).

La répartition des espèces au sein du Triangle de Corail

Au sein de l'Indo-Pacifique, le manque de barrières infranchissables permanentes (telles que les ponts continentaux) a contribué au maintien d'espèces à large aire de répartition allant de la côte Africaine jusqu'aux îles du Pacifique ou dans certains cas, du Pacifique aux côtes Américaines (Hughes et al. 2002, Reece et al. 2011, Lord et al. 2012, Mennesson et al. *submitted*). Cependant, la combinaison de l'activité tectonique avec la mise en place de quelques barrières semi-permanentes (Barber et al. 2000 et 2002, Santini & Winterbottom 2002), dues notamment à la fluctuation des niveaux marins, a conduit à la formation d'une distribution complexe de taxons incluant des espèces endémiques et d'autres à large répartition caractérisant l'océan Indien, le TC et l'océan Pacifique (Bellwood & Wainwright 2002, Jones et al. 2002, Connolly et al. 2003, Hoeksema 2007, Lord et al. 2012, Taillebois et al. 2013,

Menesson et al. *submitted*). Ainsi, il semble difficile d'identifier le centre d'origine des taxons et leurs évolutions et donc, le début et la direction de la dispersion de ces taxons entre les régions.

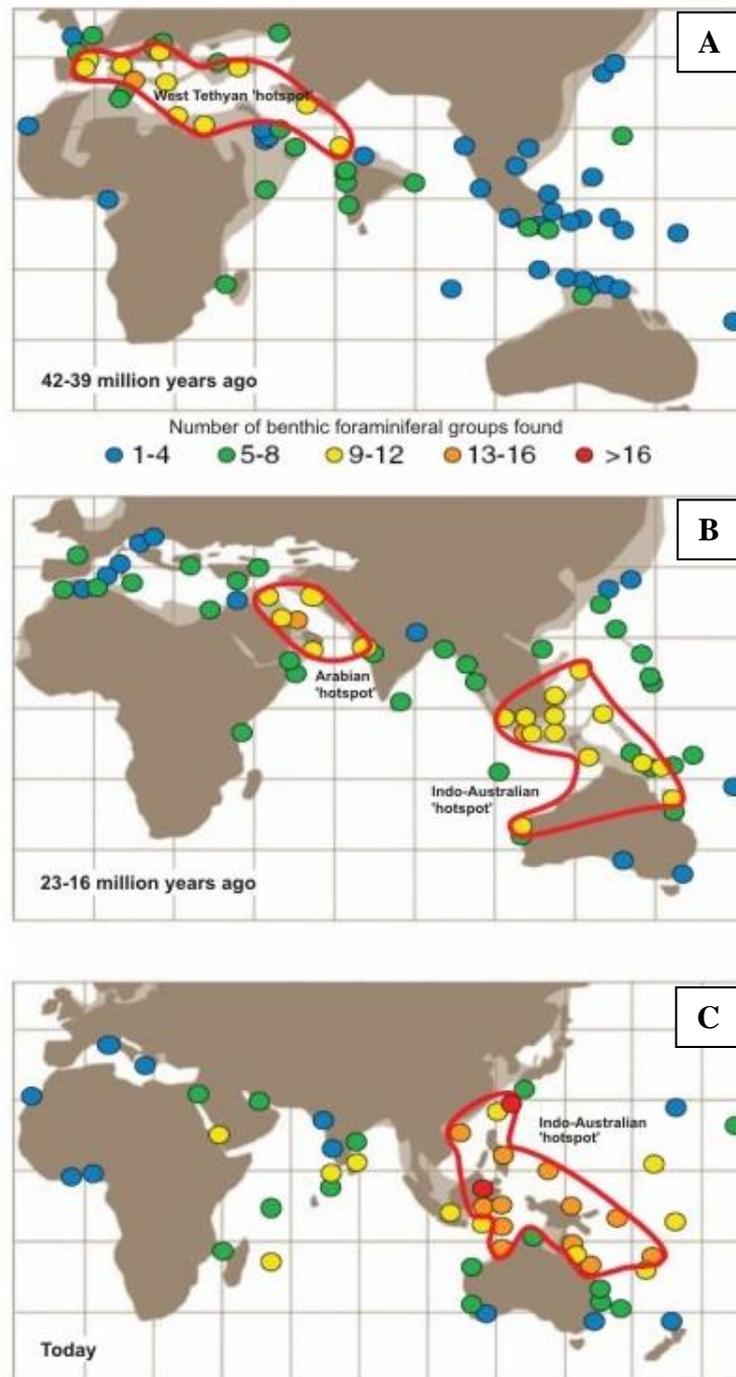


Figure 3 : α - diversité d'un large nombre d'espèces de foraminifères – A : à la fin du milieu de l'Eocène (42-39 Ma) ; B : au début du Miocène (23-16 Ma) et C : Aujourd'hui. (Modifié d'après Renema et al. 2008).

Pour un grand nombre d'espèces, des questions essentielles restent irrésolues :
i- De quelle région biogéographique provient la lignée de l'espèce étudiée ? ii- Dans quelle mesure cette région peut-elle contribuer au pattern de diversité ? iii- Comment la dispersion affecte la distribution de l'espèce ? iv- Pourquoi deux espèces ayant la même répartition géographique et appartenant au même genre ne sont pas soumises aux mêmes barrières à la dispersion ?

Ces questions sur la compréhension de la répartition d'une espèce restent parfois sans réponses et poussent les scientifiques à s'interroger sur le rôle de ce hotspot biologique qu'est le TC.

En conséquence, de nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer la répartition des espèces actuelles ; la première considère le **TC** comme un « **centre d'origine** » où s'effectueraient les événements de spéciation, ainsi cette région émettrait de nouvelles espèces vers des habitats périphériques tels que les îles de l'océan Pacifique et Indien (Ekman 1953, Barber & Bellwood 2005, Cowman & Bellwood 2011). Pour la seconde hypothèse, les zones où auraient lieu les processus de spéciation seraient celles qui sont isolées en périphérie ainsi, les nouvelles espèces seraient transportées par les courants marins vers le TC qui serait alors un « **centre d'accumulation** » (Ladd 1960). Dans la troisième hypothèse le TC serait un « **centre de recouvrement** » autrement dit, un carrefour entre différentes provinces biogéographiques (Planes & Galzin 1997). Cependant, les études phylogénétiques et phylogéographiques varient dans leur conclusion en fonction des taxons, de la méthodologie et de la stratégie d'échantillonnage. Certains taxons semblent montrer une spéciation péripatrique¹ (ex : Malay & Paulay 2010, Benzie et al. 2002) tandis que d'autres semblent diverger au sein du TC (ex : Barber et al. 2006, DeBoer et al. 2008, Timm et al. 2008). De nombreux taxons mettent en évidence que l'étendue et la diversité des habitats du TC les aident à diminuer leur risque d'extinction (Williams & Reid 2004, Barber & Bellwood 2005), ajoutant ainsi une quatrième hypothèse, celle du « **centre de refuge** », à la répartition des espèces actuelles.

Un grand nombre d'études ont été menées afin de comprendre cette concentration de la biodiversité au sein du TC (Keyse et al. 2014). Et certaines études, comme celle de Cowman & Bellwood (2013) montre que le TC a agi successivement et ensuite simultanément comme un centre i- d'accumulation (du Paléocène à l'Eocène), ii- de survie (de l'Eocène à l'Oligocène),

¹ **Péripatrique** : Se dit d'un modèle de spéciation postulant que les populations périphériques, à faible effectif, sont propices à la naissance de nouvelles espèces.

iii- d'export/expansion (Pliocène à aujourd'hui) pour les trois principales familles de poissons des récifs (Labridae, Pomacentridae et Chaetodontidae).

Il semble donc qu'il n'y ait **pas de scénario commun à toutes les espèces** pour expliquer leur répartition géographique, ce qui semble logique étant donné que les espèces n'ont pas toutes le même « âge » et par conséquent, n'ont pas la même histoire évolutive.

b. Climat, Courants océaniques et dispersion des espèces

« Le climat joue un rôle important quant à la détermination du nombre moyen d'une espèce, et le retour périodique des froids ou des sécheresses extrêmes semble être le plus efficace de tous les freins » **Charles Darwin**, *L'origine des espèces*, 1859.

Le climat

Bien que le changement de configuration des terres émergées et des océans, à partir du Tertiaire, ait affecté le mode de dispersion autour du TC, les changements climatiques ont, quant à eux, affecté le type et l'étendue des différents habitats. Au Miocène, la migration vers le Nord du continent australien a non seulement bouleversé les paramètres géologiques mais aussi les paramètres climatiques à l'échelle régionale et globale, en modifiant les patterns des courants océaniques et la distribution relative des terres et des océans (Morley 2000). Zachos et al. (2001) estiment, qu'au milieu du Miocène (17-15 Ma), le TC présentait un pic de climat chaud et humide et que par la suite, le climat global est devenu au fur et à mesure plus frais et sec (Morley 2000, Woodruff 2010). Le climat durant le **Pléistocène** (Quaternaire) a été caractérisé par de longues phases glaciaires (avec les plaines du plateau continental du Sunda² apparentes avec un climat froid et sec), entrecoupées par de courtes périodes interglaciaires chaudes et humides (estimées à 50 par Woodruff (2010)), comme de nos jours (Morley 2000, Van der Kaars & Dam 1995). Ces phases glaciaires ont donc contribué à la fluctuation du niveau marin, et lors du dernier maximum glaciaire (il y a 18 000 ans), le niveau marin était de 120 m inférieur à celui que nous connaissons actuellement (Fig. 4 & 5).

² **Sunda** : est un plateau formé d'une grande masse terrestre reliant les îles de Bornéo, Java et Sumatra avec le continent asiatique au cours du dernier maximum glaciaire et de temps en temps dans un passé plus distant.

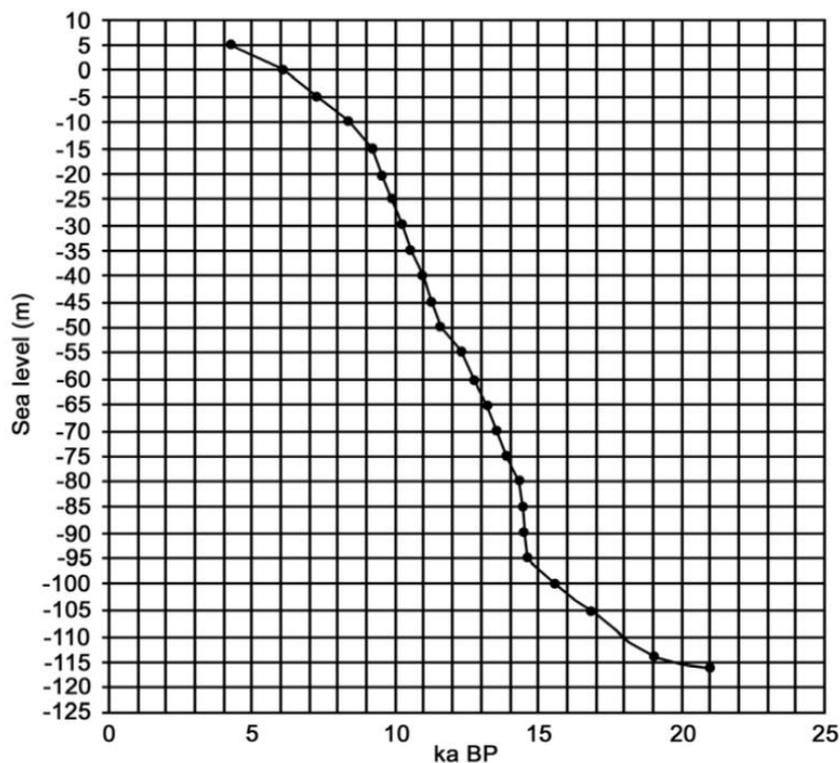


Figure 4 : Courbe du niveau marin de 21 000 à 4200 ans utilisée par Sathiamurthy & Voris (2006)

Au cours de l'Holocène, le niveau marin est progressivement remonté avec la déglaciation, et les scientifiques considèrent qu'il s'est stabilisé il y a environ 3000 ans. Depuis, le niveau moyen de la mer a peu varié bien que, depuis quelques années nous savons que le réchauffement climatique contribue à sa hausse. En 2015, la NASA a estimé une augmentation moyenne globale de 8 cm du niveau marin entre 1992 et 2015, soit une hausse qui pourrait atteindre 90 cm en 2100. Mais nous sommes loin de ce qui s'est déroulé il y a 20 000 ans.

Ainsi, durant le Quaternaire, la fluctuation du niveau marin a fortement influencé la répartition des espèces ainsi que le niveau de diversité des populations à l'échelle mondiale en érigeant des barrières (ponts continentaux). En effet, les périodes glaciaires ont eu pour effet de stopper les échanges (ou flux génétiques) entre l'océan Indien et l'océan Pacifique (et au sein du TC) *i.e.*, de stopper la dispersion larvaire dans certaines zones.

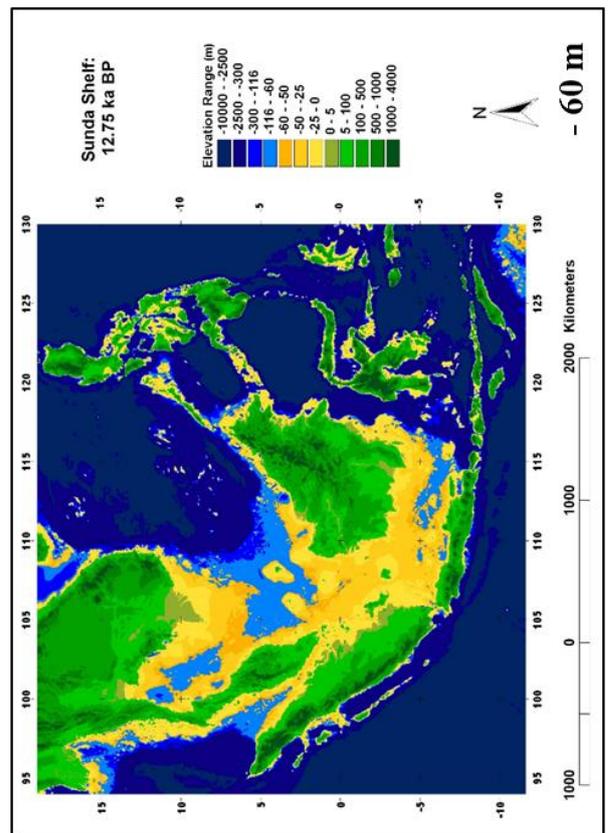
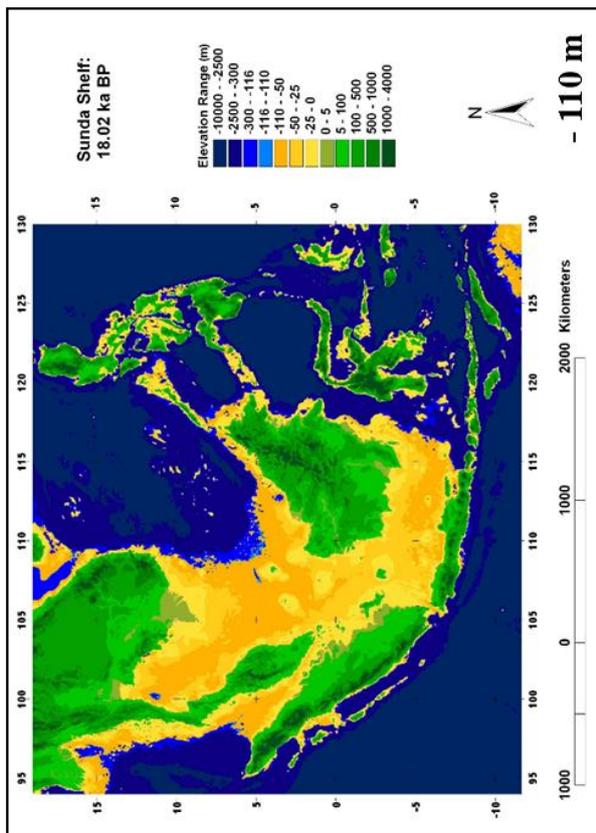
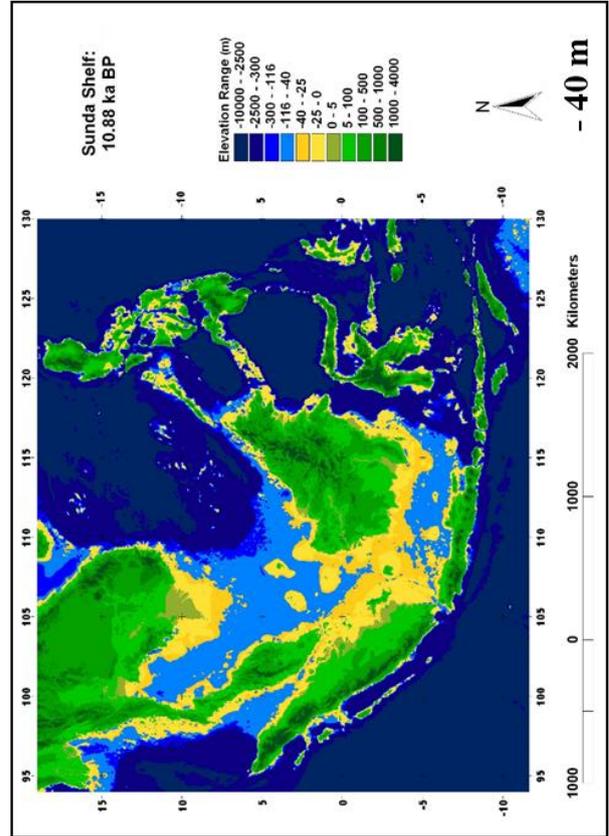
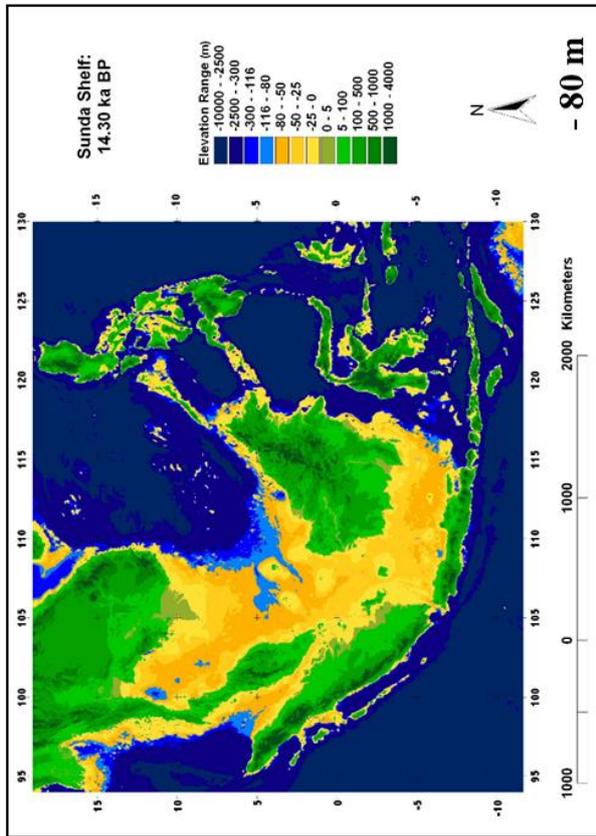


Figure 5 : Evolution du niveau marin dans le TC (ici, plateau de Sunda) au cours du dernier maximum glaciaire. Le niveau marin est indiqué en mètre par rapport au niveau actuel ; ka BP signifiant milliers d'années (ka) avant le présent (BP).

(Modifié d'après Sathiamurthy & Voris, 2006)

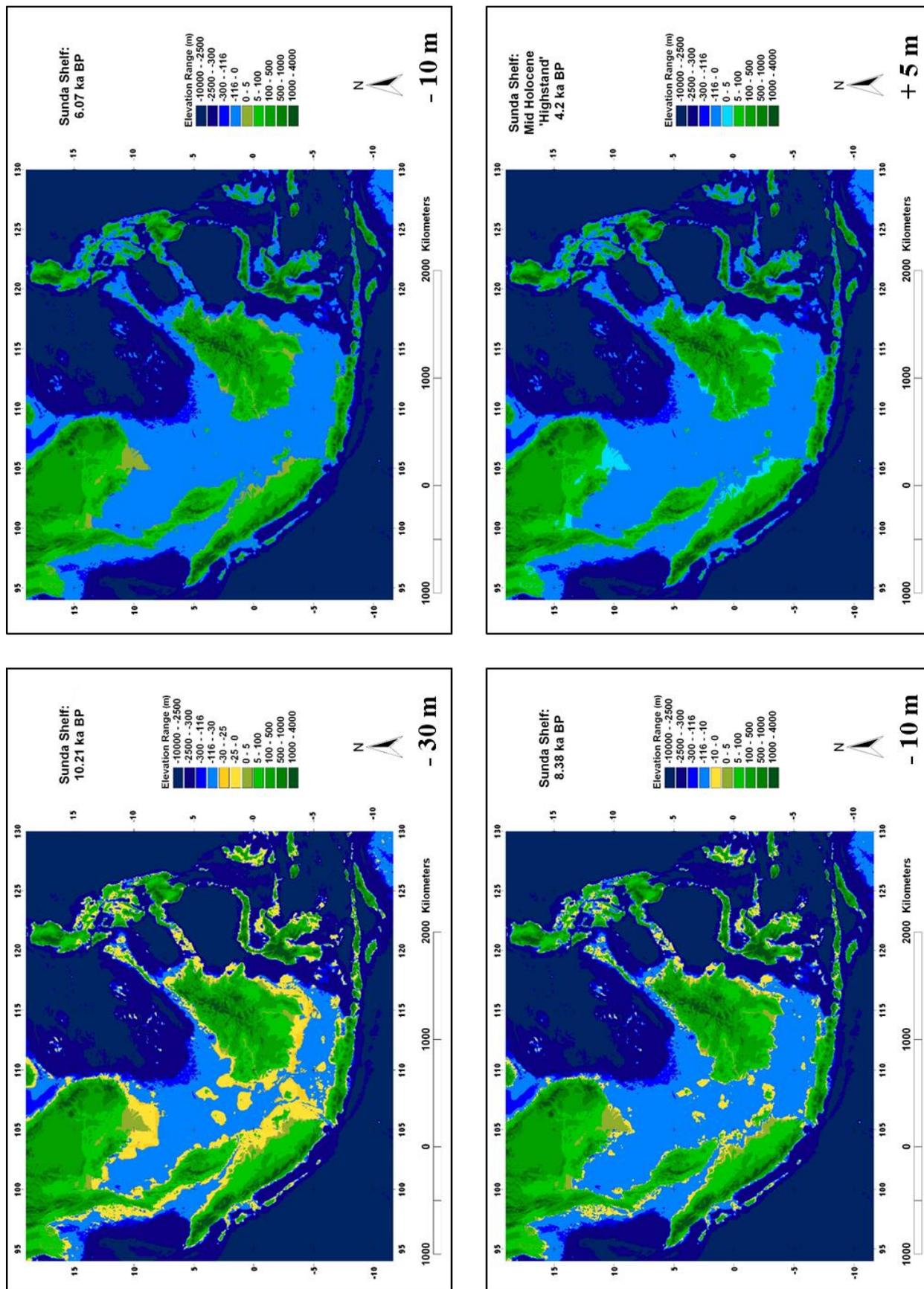


Figure 5 (suite) : Evolution du niveau marin dans le TC (ici, plateau de Sunda) au cours du dernier maximum glaciaire. Le niveau marin est indiqué en mètre par rapport au niveau actuel ; ka BP signifiant milliers d'années (ka) avant le présent (BP).

(Modifié d'après Sathiamurthy & Voris, 2006)

Courantologie, barrières et dispersion des espèces

Dans la nature, la répartition des individus dans l'espace ne se fait pas au hasard. Les membres d'une population sont rarement répartis de façon homogène, il y a presque toujours des regroupements ou des agrégations. La subdivision d'une population est souvent provoquée par la structuration du milieu et la présence par exemple de zones favorables ou non. La **dispersion** est un phénomène **ubiquiste** ; et un grand nombre d'organismes sont capables de se disperser durant une partie de leur histoire de vie (Clobert et al. 2009). De plus, la dispersion joue un rôle important pour l'écologie et l'évolution à l'échelle de l'individu, de la population (Levin, 2006) et de la communauté. La dispersion contribue à la fitness de l'individu en lui permettant d'échapper aux habitats de mauvaise qualité, aux prédateurs, et aux maladies (Bowler & Benton 2005) ; elle peut aussi influencer la taille, la stabilité et la persistance des populations (Hasting & Botsford 2006, Ker et al. 2010). L'évolution des stratégies de dispersion reflète la balance entre les coûts et les bénéfices chez l'individu par exemple, allouer une grande quantité d'énergie et de temps à la nage active plutôt que pour la croissance ou la reproduction. Cependant les coûts et les bénéfices encourus durant la dispersion sont peu documentés pour les espèces ayant des histoires de vie complexes comme celles qui effectuent une **phase larvaire marine** (Cowen et al. 2007).

La dispersion larvaire au sein des océans joue aussi un rôle important dans la répartition biogéographique des espèces marines, mais bien que très étudiée, elle présente toujours des zones de flou suivant les espèces comme par exemple : à quelle profondeur se déplacent les larves ? Sont-elles soumises à l'influence des courants de surface ? Est-ce que la topologie des fonds marins peut influencer leur migration ? D'après Grant & Bowen (1998), la dispersion des larves serait soumise à de nombreuses barrières physiques telles que la profondeur, la température, la salinité, les gyres, les patrons de courant (Borkin 1991, Hare & Cowen 1996, Murphy & Cowan, 2007) et celles-ci sont de la sorte des facteurs favorisant la différenciation des populations. Certains de ces facteurs pourraient s'avérer « positifs » pour la dispersion ; en effet, par exemple le Sud-Ouest de l'océan Indien est régulièrement affecté par des cyclones qui seraient susceptibles de modifier la surface de circulation des eaux et par conséquent, la trajectoire des larves en mer (Hoareau et al. 2007).

Dans le cas des organismes **diadromes**³ de l'Indo-Pacifique, leur répartition actuelle serait due à la présence de **barrières à la dispersion** (Lord et al. 2012, Taillebois et al. 2012, Castelin et al. 2013, Abdou 2016). Nous savons que ces dernières sont apparues durant diverses périodes géologiques, mais plus particulièrement au Pléistocène qui est certainement la période la plus importante pour expliquer la distribution actuelle des espèces dans l'Indo-Pacifique (Tornabene et al. 2015, Ahti et al. 2016). En effet, la répétition de la baisse du niveau marin durant cette période créa une barrière quasi complète entre l'océan Indien et l'océan Pacifique, l'**Indo-Pacific Barrier**⁴ (IPB) (Briggs 1974) (Fig. 5), qui a conduit à des divergences intraspécifiques chez de nombreux taxons (De Bruyn et al. 2004, De Bruyn & Mather 2007, Crandall et al. 2008, Carpenter et al. 2011, Mennesson et al. *in prep*), voire la formation d'espèces sœurs (Barber et al. 2006, Gaither & Rocha 2013, Ludt & Rocha 2015). D'autres barrières séparant des régions du Pacifique telles que la Torres Strait Barrier⁵ seront aussi mises en place (Mirams et al. 2011, Taillebois et al. 2013). Ces barrières géographiques peuvent influencer la distribution des espèces (Barber et al. 2002) en restreignant physiquement la dispersion ou en limitant le succès de la dispersion en raison de la distance entre les zones d'habitats adaptés (Gaither et al. 2010).

« (...) toutes les barrières ou tous les obstacles qui s'opposent à une libre migration sont étroitement en rapport avec les différences qui existent entre les productions de diverses régions ».

« Bien qu'un si petit nombre d'animaux marins soient communs aux trois faunes de l'Amérique orientale, de l'Amérique occidentale et des îles orientales du Pacifique, (...) beaucoup de poissons s'étendent cependant depuis l'océan Pacifique jusque dans l'océan Indien, et beaucoup de coquillages sont communs aux îles orientales de l'océan Pacifique et aux côtes orientales de l'Afrique, deux régions situées sous des méridiens presque opposés »

Charles Darwin, L'origine des espèces, 1859.

³ **Diadrome** : espèces migratrices effectuant une partie de leur cycle de vie en eau douce et le reste en mer ou inversement. Cette catégorie inclut les poissons anadromes, catadromes et amphidromes. Ces 3 catégories seront développées un peu plus loin dans le chapitre introductif.

⁴ **Indo-Pacific Barrier** : cette barrière est située au niveau des îles Indonésiennes et est souvent associée avec la formation du plateau continental de Sunda.

⁵ **Torres Strait Barrier** : est un pont continental qui a épisodiquement relié l'Australie à la Nouvelle-Guinée.

Au sein de l'Indo-Pacifique, il existe un grand nombre de courants et de contre courants. Les principaux courants de surface sont illustrés avec la Figure 6. Ces derniers peuvent avoir une forte influence sur la structuration génétique des populations pour les larves qui circuleraient dans ces profondeurs (White et al. 2010, Page et al. 2013).

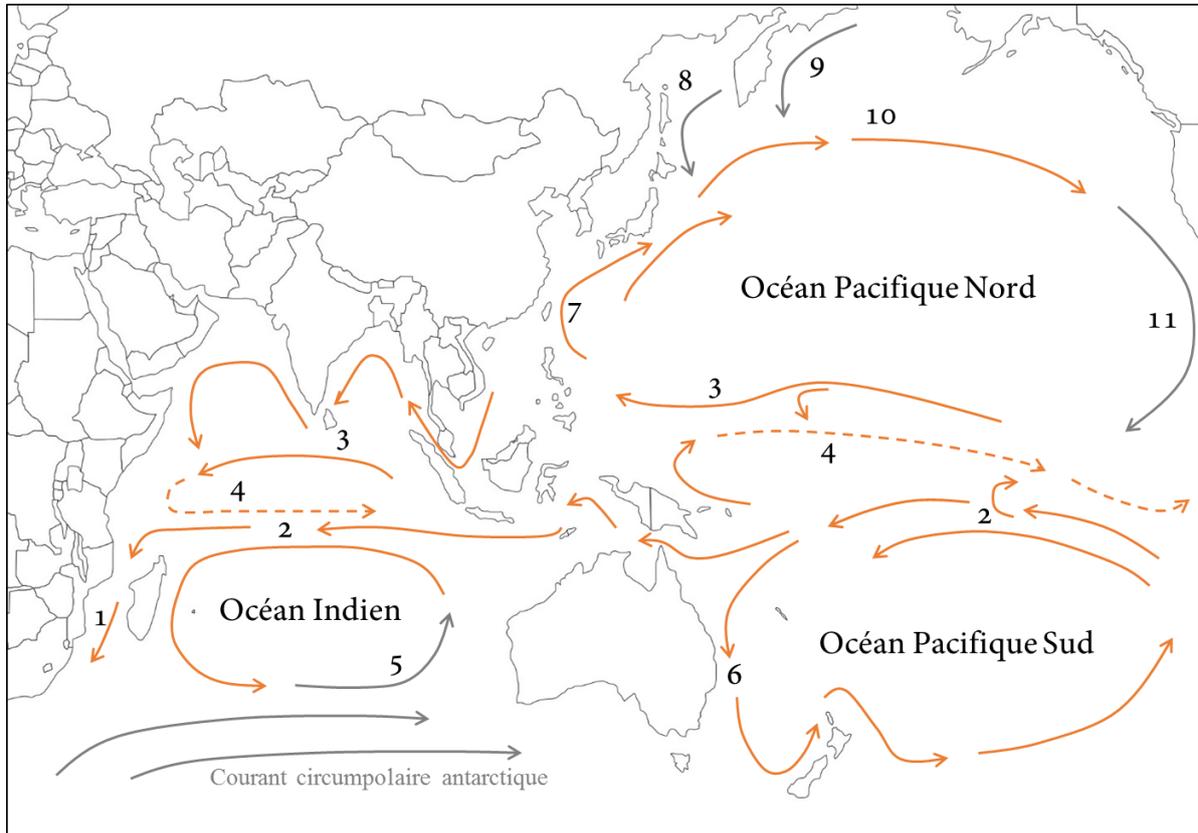


Figure 6 : Schématisation des courants océaniques de surface dans l'Indo-Pacifique. Les flèches oranges sont pour les courants chauds, les grises pour les courants froids et celles en pointillées sont pour les contre-courants.

1- Courant des Anguilles ; 2- Courant Sud Equatorial ; 3- Courant Nord Equatorial ; 4- Contre-courant Equatorial ; 5- Courant Ouest australien ; 6- Courant Est australien ; 7- Courant Kuroshio ; 8- Courant Oyashio ; 9- Courant Kamtchatka ; 10- Courant Nord Pacifique ; 11- Courant Californien.

En effet, on trouve en surface le courant Sud-Equatorial (CSE), centré sur l'équateur et allant de l'Est vers l'Ouest avec des vitesses atteignant 0,5 m/s, qui permet de faire le lien entre les provinces biogéographiques de l'océan Pacifique et de l'océan Indien. Ce lien est aussi assuré par le courant Nord-Equatorial qui se fraye un passage entre la Malaisie et l'île de Sumatra. Ce dernier est distribué au Nord de l'océan Indien tandis que le CSE se divise aux

abords de Madagascar en deux courants, le courant Nord-Est Malgache qui va rejoindre les Comores et le Sud-Est Malgache qui plonge vers les îles de la Réunion et de Maurice (Pous et al. 2010). Avec la force de Coriolis, les courants marins forment des gyres océaniques *i.e.*, des tourbillons d'eau ; parmi les 5 principaux, 3 se situent dans l'Indo-Pacifique : deux dans le Pacifique, au Nord et au Sud et un autre dans l'océan Indien (Fig. 6). Au niveau de la Polynésie règnent des conditions océanographiques particulières. En effet, les archipels de la Polynésie sont presque au cœur du gyre (sous l'influence du CSE) ; le contre-courant des Marquises est un phénomène permanent et local (Martinez et al. 2009) ; et au Sud de 20°S se trouve une turbulence qui se manifeste sous forme de gros tourbillons qui sont engendrés par des instabilités du contre-courant subtropical créant ainsi des courants pouvant changer de sens.

Sur une grande échelle géographique, les courants (actuels et passés) ne sont pas les seuls facteurs agissant sur la connectivité des espèces marines (Benzie 1998, Lessios 1998, Planes & Fauvelot 2002). En plus de la courantologie, la topologie des fonds marins peut aussi avoir un impact sur la dispersion des espèces et donc sur leur structuration génétique. Il semblerait que la présence de fosses océaniques (profondeur de l'ordre de 10 000 m voire plus) serait un frein à la migration des larves. En effet, si l'on prend l'exemple de la Polynésie au sens large (Rarotonga, Polynésie Française, Niue, îles Pitcairn, Tokelau, Tuvalu, Tonga, Samoa, Wallis et Futuna) il est observé, en dehors des espèces à large répartition, que deux types de faune existent : l'une de type mélanésien dont les limites d'extension vers l'Est ne dépassent pas Futuna et/ou Samoa, et l'autre de type polynésien dont les limites d'extension vers l'Ouest ne dépassent pas ces mêmes îles (Keith et al. 2013). Cette limite semble être due à la présence des fosses de Tonga et Kermadec. Ainsi, une combinaison de courants non favorables associés à des fosses océaniques pourrait constituer une barrière efficace à la dispersion des espèces et donc influencerait leur répartition.

Certaines études ont ainsi montré l'existence d'un lien entre le temps que passent les larves dans l'océan et la capacité de dispersion des espèces. Autrement dit, que le flux de gènes (et par conséquent, la diversité spécifique) à travers les provinces biogéographiques est parfois lié à la durée de la **phase larvaire marine** (DPL) (Doherty et al. 1995, Riginos & Victor 2001, Crandall et al. 2010, Lord et al. 2010). Néanmoins, la DPL n'est pas nécessairement un bon indicateur de la capacité de dispersion des espèces (Victor & Wellington 2000, Bowen et al. 2006, Imron et al. 2007, Weersing & Toonen, 2009, Mora et al. 2012, Taillebois et al. 2012,

Sotka 2012, Luiz et al. 2013, Mennesson et al. 2015). Prenons pour exemple deux études réalisées sur des espèces de Sicydiinae, celle de Lord et al. (2010) et Taillebois et al. (2012) ; chacune étudie 3 espèces de l'Indo-Pacifique dont une est à large répartition et les deux autres sont endémiques. Deux résultats distincts ressortent de ces études : pour Lord et al. (2010), les deux espèces endémiques présentent des DPL inférieures (de l'ordre de 50 jours) à celles trouvées chez la cosmopolite (de l'ordre de 180 jours) alors que, pour Taillebois et al. (2012) aucune différence n'a été observée entre les trois espèces ayant pourtant des répartitions très différentes. Ainsi, dans la première étude, l'endémisme peut être expliqué par de courtes DPL mais ce n'est pas le cas dans la deuxième.

c. Les rivières insulaires, notre écosystème d'étude dans l'Indo-Pacifique

Covich (2006) apporte un autre élément non négligeable à la compréhension de la dispersion des espèces, le « statut » des îles en tant qu'écosystème viable pour les communautés d'eau douce. Il définit ainsi 4 groupes d'îles en fonction de la richesse spécifique :

- i- Les îles jeunes (>10 000 d'années), isolées par de longues distances des sources d'espèces colonisatrices, présenteraient des communautés à dispersion limitée et à faible diversité.
- ii- Les îles un peu plus vieilles, plus proches des sources colonisatrices continentales, présenteraient une diversité d'espèces plus élevée et une compétition/prédation limitée.
- iii- Les îles vieilles et isolées sont censées avoir une diversité d'espèces plus élevée résultant de la combinaison d'espèces endémiques (car une longue isolation augmente la probabilité de spéciation) et d'espèces à large répartition (car elles sont adaptées à la dispersion sur de longues distances, ce qui diminue la probabilité de spéciation).
- iv- Les îles issues de la dérive des continents sont supposées présenter le plus haut taux de diversité reflétant leur histoire unique.

Ainsi, la diversité des espèces et des écosystèmes est aussi liée à la propre histoire de l'île *i.e.*, à sa genèse. Pour comprendre tous les paramètres pouvant influencer la répartition des espèces et donc la biodiversité des milieux insulaires, il est donc aussi important de comprendre comment ces derniers se sont formés et de connaître la nature des fonds marins.

« J'admets volontiers l'existence antérieure de beaucoup d'îles, actuellement ensevelies sous la mer, qui ont pu servir de relais aux plantes et aux animaux pendant leurs migrations. Lorsqu'on admettra complètement, comme on le fera un jour, que chaque espèce est sortie d'un berceau unique, et qu'à la longue nous finirions par connaître quelque chose de plus précis sur les moyens de dispersion des êtres organisés, nous pourrions spéculer avec plus de certitude sur l'ancienne extension des terres » **Charles Darwin**, L'origine des espèces, 1859.

2. Géologie des fonds marins

a. Formation des îles

Un grand nombre de milieux insulaires composent la région Indo-Pacifique, et tout comme les continents, ils sont issus du déplacement des plaques géologiques flottant sur l'asthénosphère (partie plastique du manteau supérieur). En effet, la plupart sont issues du phénomène appelé **subduction** qui se produit lorsque deux plaques convergent l'une vers l'autre. Il en résulte deux types d'îles :

- Les continentales, fragments de croûte terrestre séparés du continent. La plaque océanique plus lourde que la plaque continentale s'enfonce dans le manteau supérieur (cas n°3 de la Fig.7) ; c'est le cas par exemple de la Papouasie - Papouasie Nouvelle Guinée.
- Les océaniques issues des fonds océaniques d'origine volcanique. La plaque océanique la plus vieille (et donc la plus lourde) s'enfonce sous l'autre (Fig. 7, n°4) créant ainsi des arcs insulaires constitués d'îles volcaniques et des fosses océaniques ; c'est le cas par exemple du Japon.

Cependant, certaines îles sont issues du volcanisme intra-plaque ou « point chaud » (ou encore « hotspot ») que l'on retrouve essentiellement sur les plaques océaniques (Fig. 7, n°5).

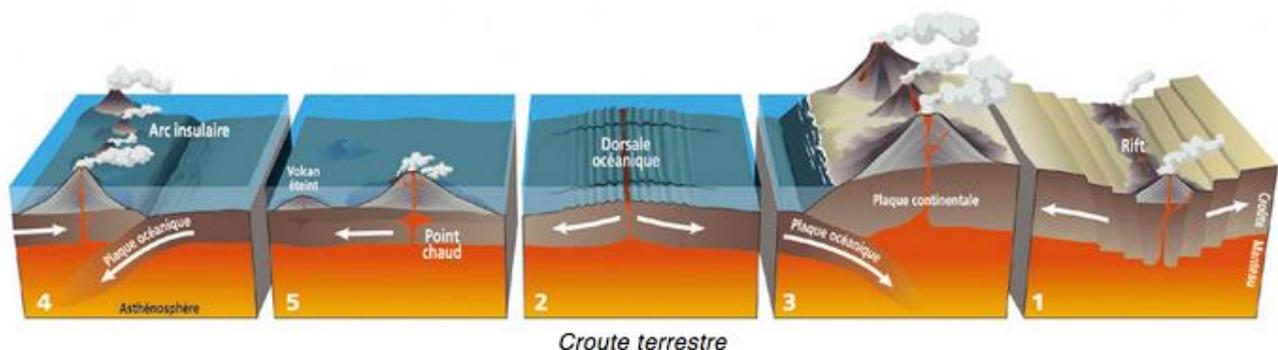


Figure 7 : Schématisation des différents cas de subduction

Les points chauds sont des régions fixes du globe produisant des remontées de matériaux du manteau qui entrent en fusion lors de leur remontée et qui perforent par intermittence la plaque océanique. Cette dernière se déplace au-dessus des points chauds de quelques centimètres par an créant ainsi (sur des millions d'années) des alignements d'îles volcaniques telles que les îles d'Hawaii ou de la Polynésie Française. En effet, tant que le volcan est à l'aplomb du point chaud, il est actif, mais dès que la plaque se déplace suffisamment, il s'éteint car la chambre magmatique n'est plus alimentée. Ainsi, plus les îles sont éloignées du point chaud, plus elles sont anciennes. Usées par l'érosion, elles finissent par devenir des atolls, puis disparaissent.

Selon leur origine géologique, leur isolement et leur ancienneté, les îles présentent une biodiversité plus ou moins riche et donc des taux d'endémismes différents. Madagascar, île continentale à l'origine séparée du Gondwana il y a environ 240 millions d'années, possède une faune et une flore similaires à celles rencontrées dans le sud des continents africain, asiatique et américain. Cependant, de par son isolement depuis des millions d'années, Madagascar présente aujourd'hui une faune et une flore unique. C'est aussi le cas de la Nouvelle-Calédonie, autre morceau du Gondwana, qui s'est trouvé isolé dans le Pacifique après sa séparation de l'Australie et de la Nouvelle-Guinée. Une telle biodiversité ne peut être observée sur toutes les îles de l'Indo-Pacifique, en particulier d'origine volcanique qui sont plus récentes. Il est donc important de prendre en compte toute l'histoire géologique de ces îles et de l'évolution de leur isolement au cours du temps afin de mieux appréhender l'histoire évolutive des espèces qui y résident.

Au cours des temps géologiques, nous savons que les continents et les îles se sont peu à peu formés pour devenir ce qu'ils sont aujourd'hui. Les mouvements des plaques tectoniques, qui sont à l'origine de leur émergence, ont aussi permis de façonner les fonds océaniques. Dans les articles scientifiques traitant de la dispersion larvaire, la topologie des fonds est peu discutée, faute d'études concernant leur potentiel pouvoir de frein à la migration. Pourtant, les scientifiques s'accordent à parler de l'influence des divers courants océaniques de surface traversant l'Indo-Pacifique or, personne n'a mis en évidence que les larves circulent au niveau des courants de surface ! L'impact potentiel des fonds océaniques sur la migration des larves n'est donc pas à négliger.

b. Expansion verticale et horizontale des fonds océaniques

Le schéma ci-dessous présentant la répartition mondiale des plaines et des monts abyssaux (Fig. 8) permet d'avoir une vision globale schématique des fonds océaniques *i.e.*, ce sont des fonds non homogènes (Fig. 9) répartis sur la totalité du globe.

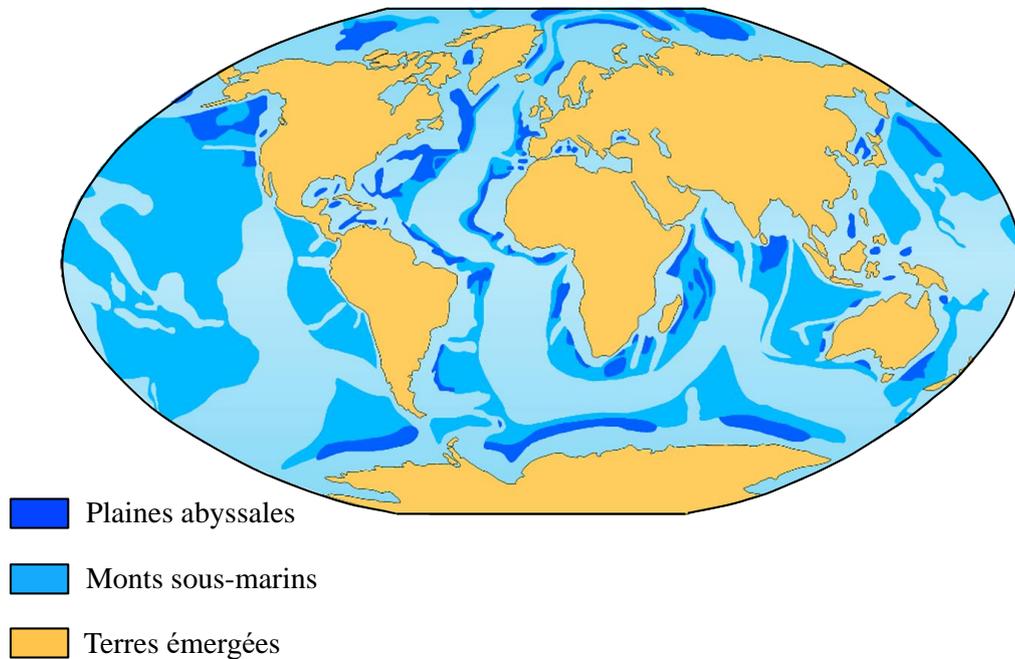


Figure 8 : Répartition des plaines et des monts abyssaux
(modifiée d'après Encyclopædia Universalis France)

Expansion horizontale des fonds

Sur le fond des océans, les zones de divergence des plaques sont marquées par les **dorsales océaniques** (n°2 sur la Fig. 7, Fig. 9) qui présentent les plus importants systèmes volcaniques de la Terre. Elles correspondent à des remontées de magma qui, lorsqu'il arrive en surface, durcit et forme alors la croûte océanique. La croûte nouvellement formée s'éloigne de part et d'autre de la dorsale (à vitesse moyenne de quelques centimètres par an) permettant ainsi la régénération des fonds marins en continu. Les dorsales océaniques constituent des **chaînes de montagnes sous-marines** sur des longueurs pouvant atteindre plus de 60 000 km. À une profondeur moyenne de 2 500 m, le sommet des dorsales est sillonné par de grandes fractures.

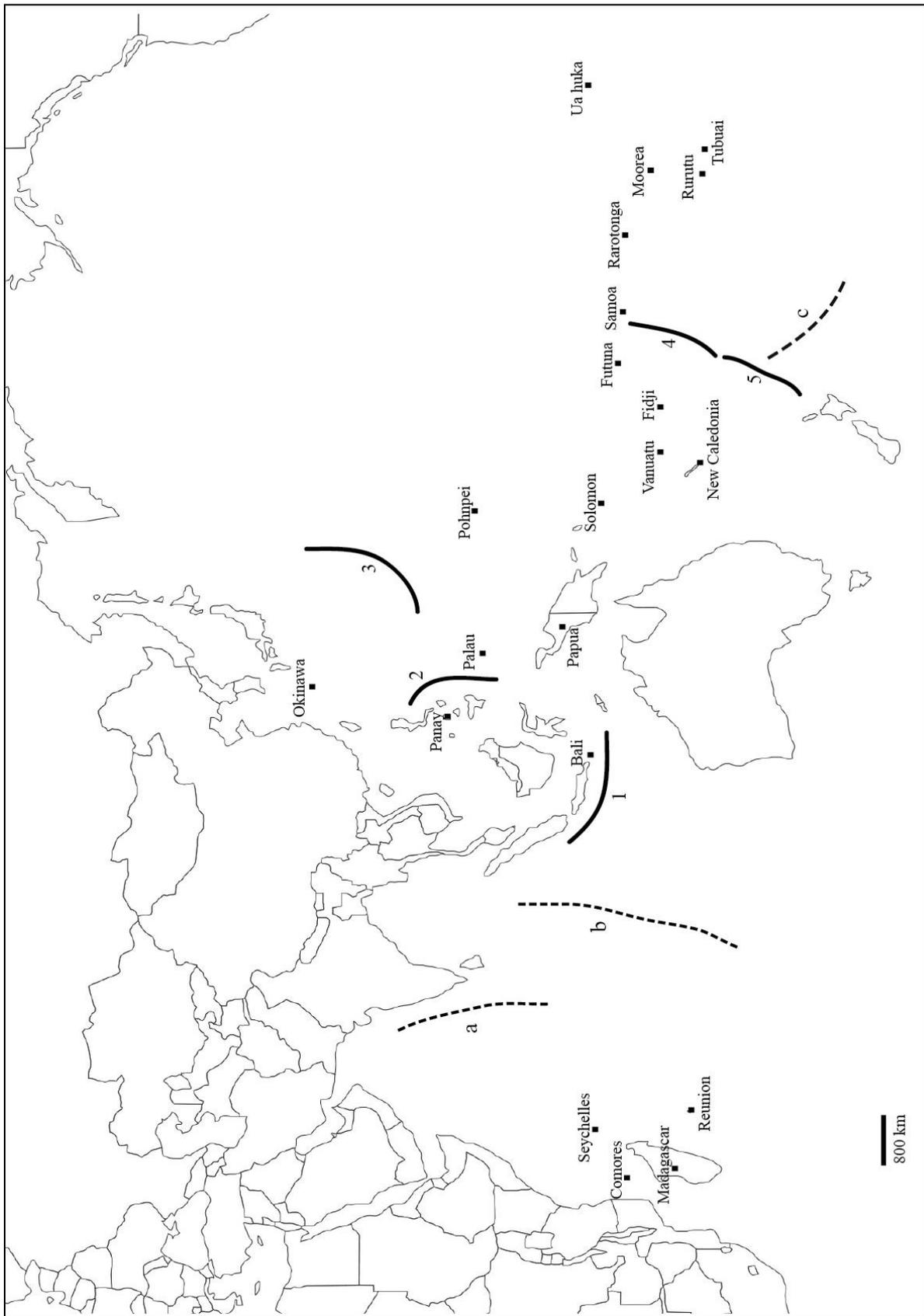


Figure 10 : Localisation des monts sous-marins – a : Chagos Laccadive (longueur de 2 350 km), b : Ride 90° Est (5 000 km) ; c : la chaîne sous-marine de Louisville (70 monts sur 4 300 km) – et des fosses océaniques – 1 : Java (profondeur de 7 400 km), 2 : Philippines, 3 : Mariana, 4 : Tonga, 5 : Kermadec.

Expansion verticale des fonds

Les **fosses océaniques** sont quant à elles de longues et profondes dépressions sous-marines longeant des continents ou des archipels volcaniques. Elles représentent les parties les plus profondes des océans sur des centaines voire des milliers de km de long, plusieurs milliers de mètres de profondeur et sont aussi le siège d'importantes activités sismiques. La fosse océanique la plus profonde est celle située au Nord-Ouest de l'océan Pacifique, la fosse des Mariannes qui atteint les 11 000 m de profondeur. Parmi toutes les fosses, les plus profondes se situent toutes dans l'océan Pacifique : la fosse de Tonga (10 882 m), la fosse de Kouriles (10 542 m), la fosse des Philippines (10 540 m) et celle des Kermadec (10 047 m) (Fig. 9).

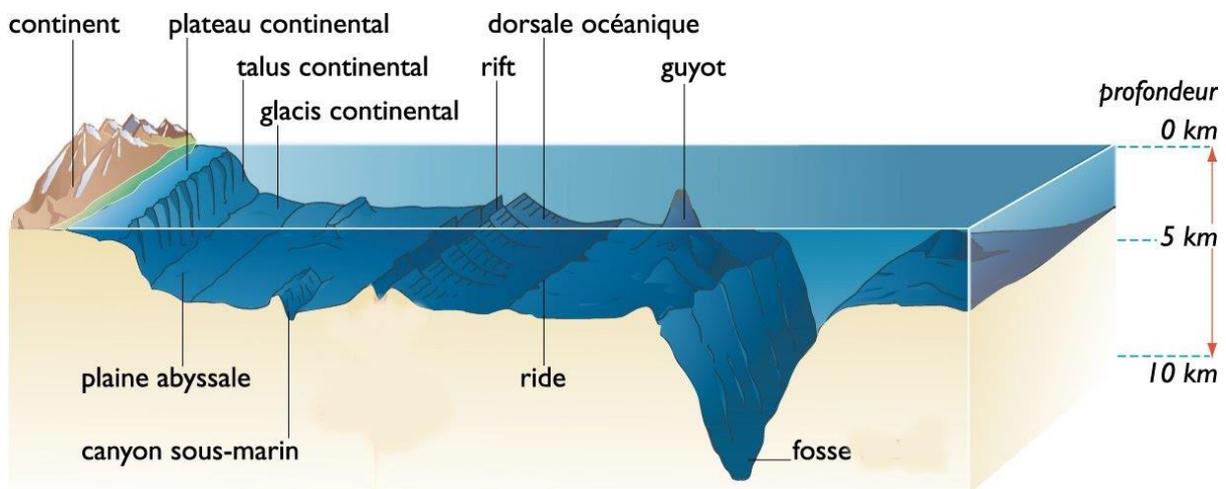


Figure 9 : Schématisation de la topologie des fonds marins

Un certain nombre d'études ont mis en évidence une différence génétique entre les populations de la Polynésie (îles Cook et Polynésie Françaises) et le reste du Pacifique (ex : Castelin et al. 2013, Lord et al. 2012, Coleman et al. 2016). Cet isolement génétique (et potentiellement géographique) est souvent expliqué par la probable combinaison du courant CSE et du contre-courant Equatorial qui ne faciliterait pas la dispersion larvaire d'un sens comme dans l'autre. Cependant, cet isolement pourrait tout aussi bien être dû à la présence des fosses de Tonga et de Kermadec entre les îles du Pacifique Sud (telles que Futuna, Fidji et les Samoa) et les îles Polynésiennes (Fig. 10) ; ou alors, être issu de la combinaison des courants et des fosses créant ainsi une barrière à la dispersion très efficace. Le maintien du hotspot de biodiversité au sein du TC pourrait aussi être expliqué par la présence de fosses de part et d'autre

de son périmètre, avec la fosse de Java et celle des Philippines, sans compter sur la géographie complexe de la zone qui comprend un très grand nombre d'îles très proches les unes des autres.

Tout ce qui a été détaillé précédemment (variation paléoclimatiques, niveaux marins, formations des îles, topologie des fonds et courants ...) a été impliqué à différents niveaux et différents moments dans la mise en place des espèces, leur dispersion, et dans la structuration de leurs populations, mais le scénario a probablement été différent selon les taxons. Pour compléter et préciser la compréhension de l'évolution et de la dispersion de ceux-ci, il est aussi nécessaire d'étudier leurs traits d'histoire de vie liés à la dispersion. C'est ce que nous nous attacherons à faire sur le modèle choisi pour cette étude.

II. La diadromie : cycle de vie clé dans la colonisation des milieux dulçaquicoles des îles tropicales et subtropicales

1. Emergence des milieux dulçaquicoles

« Il ne faut pas oublier que lorsqu'un étang ou un ruisseau se forme pour la première fois, sur l'îlot en voie de soulèvement par exemple, cette station aquatique est inoccupée ; en conséquence, un seul œuf ou une seule graine a toutes chances de se développer ». **Charles Darwin**, L'origine des espèces, 1859.

Dans les îles volcaniques de l'Indo-Pacifique, il n'existe pas, à l'origine, de poissons d'eau douce dit « vrais » car, lors de l'émergence de ces îles, aucune rivière n'est formée et elles sont de ce fait dépourvues de toute faune ichthyologique. Au cours du temps, les phénomènes météorologiques vont façonner la topologie des îles ; en effet, les vents et la pluviométrie provoquent l'érosion des montagnes et des volcans entraînant progressivement la création d'un réseau hydrographique plus ou moins dense. A leur apparition, les rivières ne peuvent être colonisées que par des espèces provenant du milieu marin. De ce fait, les peuplements dulçaquicoles des systèmes insulaires sont dominés par des espèces dites **diadromes** *i.e.*, se développant alternativement entre l'eau douce et l'eau salée ; **notre modèle d'étude se situe dans cette catégorie.**

2. Stratégie de colonisation : la diadromie

Le terme de « diadromie », employé par Myers en 1949 et qu'il subdivise en 3 catégories, désigne les poissons qui sont aptes à migrer alternativement entre des biomes marins et d'eau douce tout au long des différents stades de leur vie. Le temps passé dans chaque biome peut être relativement long et entraîne l'apparition de changements morphologiques et physiologiques importants (McDowall 2007). Les 3 catégories de diadromie redéfinies par McDowall (1992) sont (Fig.12) :

- La **catadromie** : les poissons catadromes passent la majeure partie de leur vie en eau douce et migrent vers la mer pour se reproduire (ex : Anguilles, Flets, Mulets).
- L'**anadromie** : les poissons anadromes passent la majeure partie de leur vie en mer et migrent vers l'eau douce pour se reproduire (ex : Saumons, Truites, Aloses).
- L'**amphidromie** : la migration entre l'eau douce et l'eau de mer n'a pas pour objectif la reproduction, comme c'est le cas pour les 2 catégories précédentes. Néanmoins, tout comme les poissons anadromes, la reproduction se fait en eau douce.

Dans les milieux insulaires, c'est l'**amphidromie** qui s'est largement développée, tant chez les téléostéens, en particulier chez les Gobiidae et les Eleotridae (Keith & Lord 2011), que chez les crustacés décapodes (Dennenmoser et al. 2010) ou les mollusques (Crandall et al. 2010, Abdou et al. 2015) ; en effet, ce sont les espèces amphidromes qui constituent la **biodiversité la plus importante** et elles ont souvent un **fort taux d'endémisme** (Nelson et al. 1997, Keith et al. 2007, Watson et al. 2007). D'une façon générale, les poissons amphidromes pondent leurs œufs en rivière (Delacroix & Champeau 1992, Keith et al. 1999, McDowall 2007). Après éclosion, les larves, entraînées par le courant, ont environ 72 heures pour rejoindre la mer (Keith et al. 2008), où elles utiliseront leurs réserves vitellines jusqu'à l'ouverture de la bouche (Delacroix & Champeau 1992). Elles séjournent ensuite 3 à 6 mois en mer, où elles vont grandir et passer par plusieurs stades larvaires (ouverture de la bouche, mise en place des organes internes...) (McDowall et al. 1994, Hoareau 2005, Keith et al. 2008, Ellien et al. 2014). Enfin, les individus reviennent en eau douce à l'état de post-larves, se métamorphosent (pour certains groupes d'espèces) (Keith et al. 2008) et colonisent les rivières et l'habitat adulte (Fig. 13).

L'**amphidromie** est donc considérée comme une adaptation à la vie dulçaquicole dans les milieux insulaires, habitats isolés et fragmentés ; **la phase de dispersion** (phase larvaire en mer) étant un **élément clé dans la colonisation de ces systèmes**.

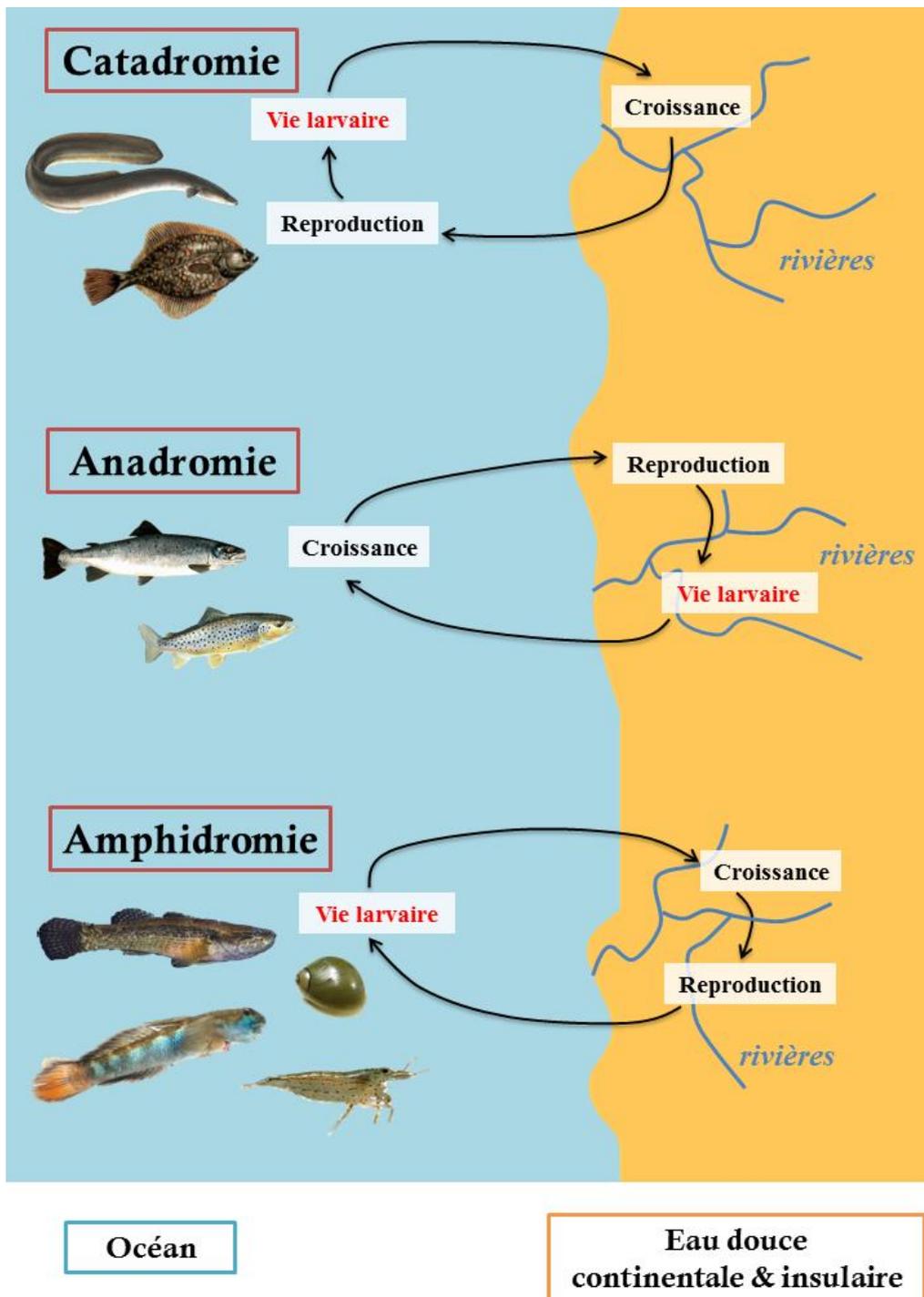


Figure 12 : Représentation schématique des trois stratégies de diadromie (© Mennesson)

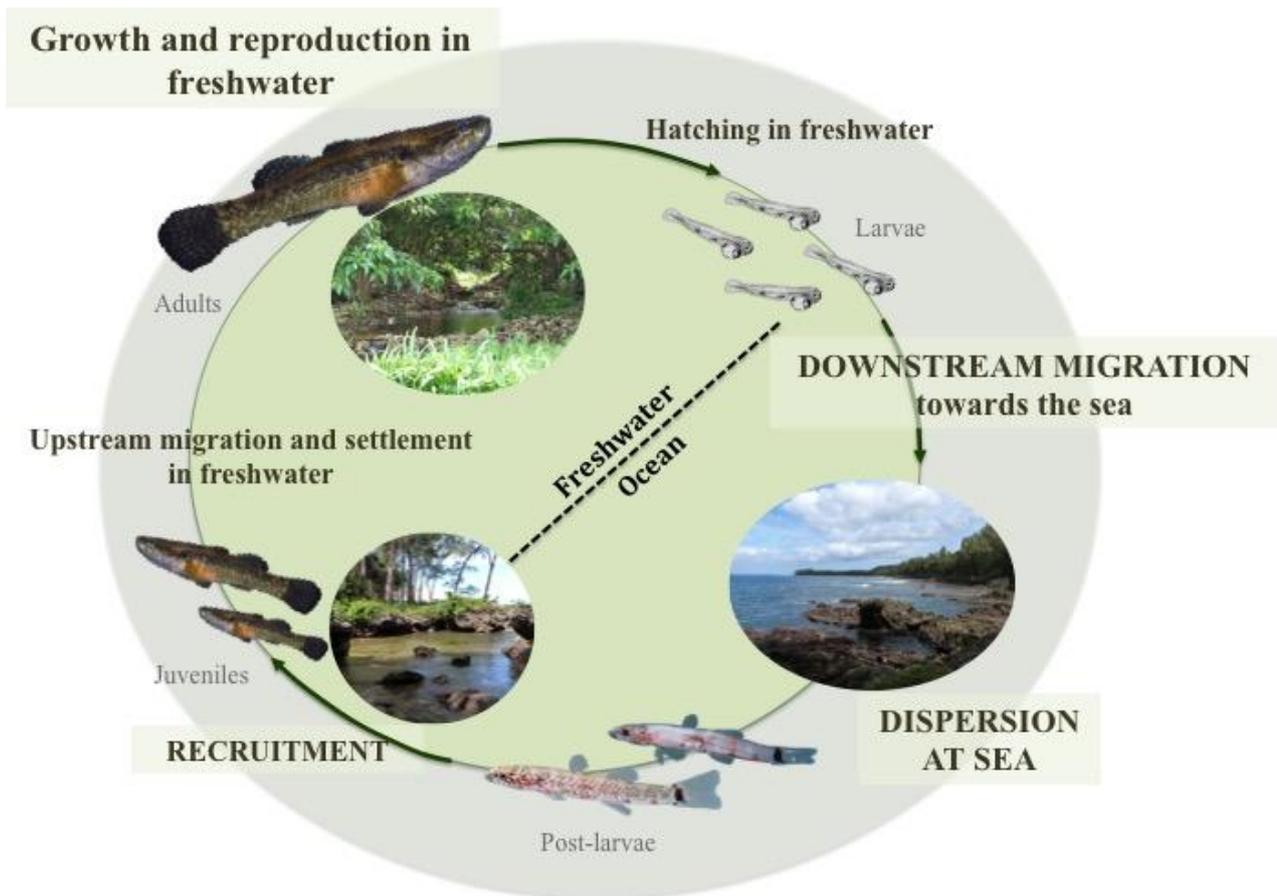


Figure 13 : Cycle de vie amphidrome à partir de l'exemple d'*Eleotris fusca* (Teleostei: Eleotridae) (© Mennesson)

En raison des **remontées massives des larves** dans les rivières à certaines périodes de l'année, les espèces amphidromes sont, dans certains archipels, **une ressource alimentaire importante** pour les populations locales, mais une ressource alimentaire très fragile, parfois même au bord de l'extinction (Keith 2003). Du fait de l'augmentation de la pression humaine sur ces espèces, la compréhension de l'écologie de ces organismes diadromes est cruciale pour l'élaboration et la mise en place de moyens de gestion et de conservation de ces derniers et de leurs habitats (Lord et al. 2010).

3. Impacts des activités anthropiques sur les milieux d'eau douce

Parmi les Téléostéens, les **deux familles** qui **dominent** les peuplements **amphidromes dans les rivières** (**Gobiidae** et les **Eleotridae**) sont fortement **soumises aux impacts anthropiques**. Les enjeux de gestion et de conservation sont donc très importants.

Avant-propos

Echantillonner les îles de l'Indo-Pacifique dans le cadre d'une étude écologique n'est pas chose facile car toutes ne sont pas accessibles, que ce soit d'un point de vue géographique et/ou politique. Les îles de l'Indo-Pacifique font souvent rêver avec leurs plages de sable fin et leur eau turquoise mais la réalité peut être toute autre. L'état de « santé » d'une île ne se résume pas en effet à ses côtes ni à ses récifs coralliens. Pour la faune et la flore terrestres et dulçaquicoles ce qui est le plus important c'est avant tout l'état des cours d'eau. Pour les populations locales, les rivières sont sources d'eau potable et de nourriture, le maintien de la qualité de l'eau et de sa quantité sur les îles est l'un des enjeux majeurs du 21^{ème} siècle. Un rapide état des lieux des îles échantillonnées est donc primordial afin de mieux comprendre les enjeux de notre étude.

Pour la majorité des îles de l'Indo-Pacifique, le climat évolue selon deux saisons bien marquées ; durant la saison relativement sèche (juillet à novembre) les rivières voient leur débit décroître progressivement ; durant l'été pluvieux (décembre à juin) les débits sont élevés et souvent associés aux crues maximales dues au passage des cyclones et des dépressions tropicales. Les crues sont brutales et les effets des précipitations cycloniques (crues exceptionnelles) sont accentués par les fortes pentes et un couvert végétal souvent dégradé. Cependant, les dégradations impactant les populations ichtyologiques sont surtout dues à l'Homme.

Etat actuel des îles

Les milieux insulaires sont soumis à de **nombreux problèmes d'origine anthropique** (Fig. 11). L'augmentation des populations et de leurs besoins ont des conséquences sur l'environnement, déjà fragilisé, et sur les ressources biologiques disponibles limitées. Avec le réchauffement climatique, les cyclones sont plus fréquents et plus dévastateurs, ainsi que les sécheresses et les feux de forêts.

Décharges sauvages - Moroni, Comores - 2012



Déforestation liée à la culture de l'huile de palme - Bornéo, Indonésie - 2014 (© Ulet Ifansasti)



Pollution des eaux due à l'exploitation minière de nickel - Nouvelle-Calédonie - 2014



Figure 11 : Exemples d'impacts anthropiques sur l'environnement dans les milieux insulaires

L'enjeu majeur dans ces milieux est de placer sous surveillance le développement de l'urbanisme (barrages, pompages), les activités touristiques, industrielles (pollutions) et agricoles (culture intensive et utilisation de produits phytosanitaires) ; afin de limiter la **dégradation régulière des habitats naturels et la déforestation.**

Les **modifications** croissantes et incontrôlées des **bassins versants** (les décharges sauvages, le lavage traditionnel du linge, l'utilisation du brûlis, les rejets de polluants liés à l'agriculture, la construction de barrages, les extractions minières ou de graviers ...) et/ou les **introductions d'espèces exotiques** sont des menaces réelles sur la survie d'un bon nombre d'espèces aquatiques, à la fois rares et endémiques. Certaines pourraient même disparaître avant que l'on ait eu le temps de les découvrir, ou de comprendre les besoins vitaux associés à leur survie. Il est donc impératif, si l'on veut arrêter le déclin de certaines populations d'eau douce, de comprendre les facteurs (humains ou parfois naturels) qui y contribuent et de fournir ensuite des outils et des recommandations qui puissent aider les gestionnaires.

Dans cette optique et dans le cas des espèces dulçaquicoles, il convient au préalable de toute étude sur des espèces ou des communautés :

- ✓ D'identifier, dans un 1^{er} lieu, les espèces qui sont présentes dans les cours d'eau afin d'en tirer une liste précisant la présence (avec ou non l'abondance) ou l'absence de certaines espèces. La taxonomie joue donc ici un rôle important car il convient toujours de savoir d'abord de quelle espèce on parle.
- ✓ D'étudier, en un 2nd lieu, ces espèces afin de récolter un maximum d'informations tels que le type d'habitat associé à chaque stade du cycle de vie, le régime alimentaire, le comportement et la place de chaque espèce dans l'écosystème etc. L'étude des traits de vie des espèces est essentielle à la compréhension de la dispersion et du maintien de celles-ci dans les milieux étudiés.
- ✓ De repérer, enfin, les menaces qui contribuent au déclin des habitats des espèces indigènes et de voir comment nous pouvons améliorer la gestion de ces milieux en réponses à ces menaces.

III. Modèle d'étude : le genre *Eleotris*

1. Ecologie du genre

Les *Eleotris* sont des Téléostéens de l'ordre des Perciformes, du sous-ordre des Gobioidi et de la famille des Eleotridae. Leur taille moyenne est comprise entre 4 et 13 mm. Ils sont **carnivores, euryhalins** et sont présents essentiellement dans les **eaux saumâtres**, les **estuaires** mais surtout dans les **cours inférieurs** des rivières.

Au sein de l'Indo-Pacifique, les 3 espèces d'*Eleotris* majoritairement réparties sont *E. acanthopoma* (Bleeker, 1853), *E. fusca* (Bloch & Schneider, 1801) et *E. melanosoma* (Bleeker, 1853) mais peu de choses sont connues sur leur biologie. Seuls les japonais se sont intéressés de près à ces espèces, et plus particulièrement aux deux premières, au travers de travaux réalisés dans les rivières de l'île d'Okinawa. Les *Eleotris* sont des espèces plutôt **diurnes**, ils se cachent la journée et sortent la nuit (Iwata 1989). Ils recherchent leur nourriture activement durant la nuit quand leurs proies (ex : crevettes et les crabes) sont actives et leurs prédateurs (ex : les oiseaux) inactifs. De nombreuses études, ont mis en évidence que les *Eleotris* consomment principalement des escargots aquatiques (Herre 1927, Teixeira 1994, Nordlie 1979 et 1981, Resh et al. 1999, cette étude). Et, d'après Maeda et Tachihara (2004), les *Eleotris* peuvent ingérer des escargots dont la taille de la coquille est supérieure à 1 cm et ne pouvant l'excréter par l'anus, ils sont par conséquent obligés de la recracher. Toutefois, le régime alimentaire des *Eleotris* peut être modifié si ces derniers vivent en sympatrie⁶.

Maeda et Tachihara (2004) et Mennesson (obs. pers.) ont montré que les 3 *Eleotris* présentent des distributions bien définies au sein des cours d'eau :

- *E. acanthopoma* et *E. melanosoma* sont présents dans les estuaires, les criques d'eau douce, les marais et les champs de riz. *E. melanosoma* se trouve plutôt dans les eaux saumâtres *i.e.*, les estuaires, et *E. acanthopoma* peut être à la fois en zone tidale et un peu plus en amont en eau douce.
- *E. fusca* est uniquement présent en eau douce et peut monter bien plus en amont que *E. acanthopoma*.

⁶ Sympatrie : désigne l'existence de deux espèces phylogénétiquement proches, vivant sur un même territoire, mais ne s'hybridant pas.

Maeda et Tachihara (2004) ont aussi mis en évidence que bien que *E. acanthopoma* et *E. fusca* peuvent se trouver dans une même partie d'un cours d'eau, ces derniers ne se nourrissent pas de la même façon. En effet, la première espèce se nourrit essentiellement de crabes dans la zone tidale et d'escargots en amont alors que la seconde se nourrit surtout de crevettes.

En étudiant la reproduction des *Eleotris*, Maeda et al. (2008) mettent en évidence que la distribution des masses d'œufs est corrélée avec les habitats préférentiels des adultes, ce qui suggère que ces espèces pondent dans leur milieu habituel sans effectuer de migration pour la ponte. La mesure des œufs et des larves venant d'éclore permet de voir que ces derniers sont de plus petite taille chez *E. acanthopoma* que chez *E. fusca* ; ceci a aussi été observé chez les post-larves (Maeda et al. 2007, cette étude). Dans leur étude, les différents stades du développement larvaire sont décrits (Fig. 14) et l'éclosion des larves est observée uniquement du crépuscule à minuit.

Mais aucune étude en revanche n'a été réalisée sur leur dispersion, en particulier sur l'ensemble de leur aire de répartition.

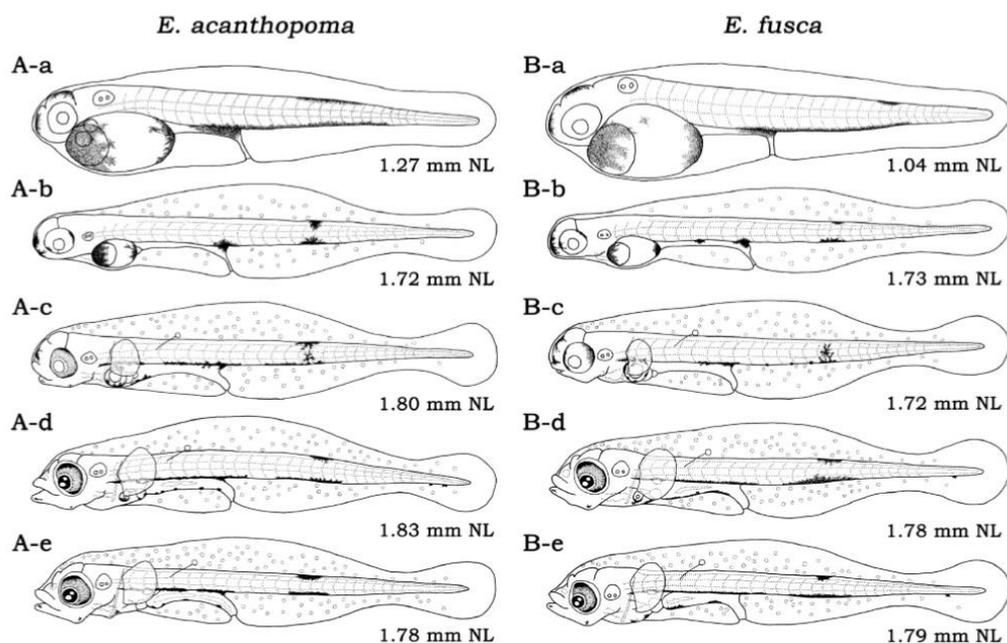


Figure 14 : Développement larvaire chez *E. acanthopoma* et *E. fusca* immédiatement après éclosion. A-b, B-b : 1 jour ; A-c, B-c : 2 jours ; A-d, B-d : 3 jours ; A-e, B-e : 4 jours après éclosion. NL : Longueur de la notochorde (Modifié d'après Maeda et al. 2008).

Les *Eleotris* aiment se fondre dans leur environnement afin d'être plus efficace lors de la prédation ; ils se comportent un peu comme des caméléons (Fig. 15). Les substrats des rivières des îles étant la plupart du temps de couleur sombre, les *Eleotris* se retrouvent avec un **pattern de couleur similaire** (brun à brun foncé voire noir), quelle que soit l'espèce (Fig. 16). De ce fait, l'identification sur le terrain ne peut être basée uniquement sur le pattern de couleurs contrairement à d'autres espèces de Gobioides tels que les Sicydiinae. Il n'y a pas non plus de dichroïsme sexuel.

La **taxonomie**⁷ de ce **genre** est difficile et reste **confuse**, mais ces espèces constituent un maillon clé du fonctionnement des écosystèmes dulçaquicoles insulaires.

⁷ Ici, le terme de « taxonomie » (ou taxinomie) est utilisé comme un synonyme de celui de la systématique *i.e.*, selon la théorie et la pratique de la classification (Matile et al. 1987).

Spécimens d'*E. fusca* capturés sur le terrain (Gaua - Vanuatu)

A. Fraichement capturés, les specimens sont de deux marrons, clair sur le dos et foncé sur les flancs

B. Après plus de 4h de captivité, les spécimens se fondent dans leur environnement et deviennent clair

C. *E. fusca* est souvent identifié comme étant plus foncé que *E. acanthopoma* or, dans les rivières de Gaua, c'est le contraire.



Figure 15 : Photos prises sur le terrain à Gaua (Vanuatu) montrant plusieurs patterns de coloration chez *E. fusca* (© Mennesson)



Figure 16 : Planche photos d'*Eleotris* échantillonnés en Indonésie
A - C : *E. fusca*, D- E : *E. melanosoma* (Photos Hubert N. – BIF)



Figure 16 (suite) : Planche photos d'*Eleotris* échantillonnés en Indonésie
F : *E. melanosoma*, G - I : *E. acanthopoma*. (Photos Hubert N. – BIF)

Il est intéressant de constater que toutes ces espèces se ressemblent fortement et qu'à première vue, on ne peut les distinguer les unes des autres. Sauf peut-être le spécimen I qui présente une dorsale d'un jaune vif mais pourtant, il appartient à la même espèce que les spécimens G et H.

2. Complexité du genre – concept d’espèce – taxonomie

Selon Eschmeyer & Fricke (2016) et Kottelat (2013), **il existerait 14 espèces valides d’*Eleotris* réparties dans l’Indo-Pacifique** (Tableau 1) avec pour chacune un grand nombre de synonymes. Si nous comptabilisons ces derniers, nous sommes **à plus de 34 noms d’espèces d’*Eleotris* répertoriés** dans les bases de données telle que celle du « Catalog of Fishes »⁸ de Eschmeyer (California Academy of Sciences, CAS) ou FishBase⁹.

Tableau 1 : Liste des espèces d’*Eleotris* de l’Indo-Pacifique valides de l’Indo-Pacifique selon Eschmeyer (CAS) et Kottelat (2013). Les espèces sont classées par date de description.

Nom valide	Auteur(s)	Localité type	Statuts Eschmeyer-Kottelat
<i>Eleotris fusca</i>	Bloch & Schneider, 1801	Raiatea, French	espèce
<i>Eleotris mauritiana</i>	Bennett, 1832	West Indian Ocean	espèce
<i>Eleotris oxycephala</i>	Temminck & Schlegel, 1845	Japon	espèce
<i>Eleotris acanthopoma</i>	Bleeker, 1853	Sumatra	espèce
<i>Eleotris melanosoma</i>	Bleeker, 1853	Western Sumatra, Waihai	espèce
<i>Eleotris sandwicensis</i>	Vaillant & Sauvage 1875	Hawaiian Islands	espèce
<i>Eleotris lutea</i>	Day, 1876	Andaman Island	espèce
<i>Eleotris tubularis</i>	Heller & Snodgrass, 1903	Coco island	espèce
<i>Eleotris balia</i>	Jordan & Seale, 1905	Japon & Chine	espèce & syno. <i>E. oxycephala</i>
<i>Eleotris andamensis</i>	Herre, 1939	Andaman Island	espèce
<i>Eleotris fasciatus</i>	Chen, 1964	Taiwan	espèce
<i>Eleotris pellegrini</i>	Maugé, 1984	Madagascar	espèce
<i>Eleotris vomerodentata</i>	Maugé, 1984	Madagascar	espèce
<i>Eleotris aquadulcis</i>	Allen & Coates, 1990	Papua	espèce

Il y aurait donc un grand nombre d’espèces d’*Eleotris* au sein de l’Indo-Pacifique, mais la **taxonomie de ce groupe n’a jamais été approfondie** et tout reste à faire.

Toute recherche visant à **étudier les espèces d’*Eleotris*** nécessite donc, dans un premier temps, **de résoudre la taxonomie du genre** afin de pouvoir **relier avec certitude les traits d’histoire de vie** que nous souhaitons observer **aux « bonnes » espèces**. En effet, il est primordial avant toute étude de biologie ou d’écologie de savoir de quelle espèce nous parlons.

⁸ Site internet, <http://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes>

⁹ Site internet, <http://www.fishbase.org/>

« Si l'espèce est la catégorie fondamentale des classifications hiérarchiques, son importance est tout aussi grande dans toutes les autres disciplines de la biologie, où la détermination exacte de l'objet d'étude constitue un préliminaire indispensable à toute recherche » (Matile et al. 1987).

Il existe un grand nombre de concept pour définir une espèce. Dans le cadre de cette étude, nous assumons le choix du **concept dit « évolutif »** qui considère une espèce comme une entité composée d'organismes maintenant son identité (mise en place de caractères diagnostiques pour définir les lignées) par rapport aux autres dans le temps et dans l'espace et ce, avec son propre passé évolutif et son propre destin. Et plus précisément, c'est le concept évolutif de Wiley et Mayden (2000) qui sera utilisé *i.e.*, une relation étroite entre la taxonomie, la phylogénie, la biogéographie et la biologie évolutive, tout en prenant en compte l'aspect temporel.

Ce concept d'espèce nous amène à la notion de « **taxonomie intégrative** » qui a été introduite en 2005 (Dayrat 2005, Will et al. 2005). Cette approche intégrative est une méthode permettant de délimiter et de décrire les espèces en intégrant des informations issues de nombreux **jeux de données complémentaires et indépendants** (*i.e.*, la génétique, la biogéographie, la morphologie, l'écologie, ...). En effet, comme le démontrent Pante et al. (2015a et 2015b), un certain nombre d'études, présentant de nouvelles espèces et n'utilisant qu'une seule méthode, sont erronés. Par exemple, il arrive parfois que les jeux de données moléculaires utilisés soient incomplets et donnent lieu à de mauvaises déductions ou que le temps nécessaire à la vérification taxonomique précise n'a pas été consacré. Or, il est toujours nécessaire d'avoir les données morphologiques en complément des jeux de données moléculaires afin de faciliter le travail des gestionnaires sur le terrain et ainsi, de faciliter la reconnaissance des espèces. Utiliser des jeux de données complémentaires permet de décrire au mieux les espèces cryptiques, s'il y en a, et ainsi de décrire des espèces en accord avec le Code Internationale de Nomenclature Zoologique (CINZ).

Pante et al. (2015a) insistent sur les **trois points essentiels** à respecter pour avoir le meilleur jeu de données possible pour faire de la taxonomie intégrative (incluant principalement la génétique et la biogéographie) et donc, pour éviter la possibilité d'hypothèses taxonomiques erronées :

- ✓ **1^{er} point** : la stratégie d'échantillonnage doit englober autant que possible i- l'aire de répartition connue de l'espèce étudiée, ii- des taxons qui sont étroitement apparentés à l'espèce en question ou même des groupes plus ou moins proches dont la phylogénie est peu connue.
- ✓ **2^{ème} point** : toute étude de connectivité doit être effectuée avec prudence concernant les traits d'histoire de vie de l'espèce étudiée. En effet, les traits de vie tels que la durée de vie planctonique, les caractéristiques du système reproducteur, l'organisation sociale (etc.) ont une incidence sur les modes de connectivité mais aussi sur la délimitation des espèces. Et, la stabilité spatio-temporelle de ces traits d'histoire de vie n'en sera que meilleure avec un bon plan d'échantillonnage (1^{er} point).
- ✓ **3^{ème} point** : les marqueurs génétiques utilisés doivent être multiples et diversifiés, il est primordial d'éviter l'utilisation exclusive des gènes mitochondriaux.

Afin de réaliser la meilleure étude possible du genre *Eleotris* dans l'Indo-Pacifique, nous avons choisi i- d'utiliser l'approche de la **taxonomie intégrative par congruence** *sensu* Padial et al. (2010) *i.e.*, si deux groupes d'individus sont distinguables par exemple morphologiquement et génétiquement, alors ils appartiennent à deux espèces différentes et, ii- de suivre les trois points essentiels de Pante et al. (2015a).

IV. Contexte et objectifs de la thèse

Les descriptions des *Eleotris* dans la littérature sont souvent anciennes, courtes et présentent peu d'éléments diagnostics permettant d'être sûr de la validité de l'espèce. La taxonomie reste confuse, difficile, et aucune étude n'a été réalisée pour la résoudre. Il est pourtant essentiel de clarifier la taxonomie avant toute autre étude. Dans ce contexte, sur les 34 noms d'espèces d'*Eleotris* répertoriés dans les bases de données parmi lesquels 14 seraient valides, lesquels le sont-ils vraiment ? Quels sont les traits d'histoire de vie des espèces les plus répandues ? et Quelles sont leurs aires de distribution ?

Comme nous l'avons vu précédemment, l'histoire de vie de certains *Eleotris* (*E. melanosoma*, *E. acanthopoma*, ou *E. fusca*) dans la zone Pacifique a été étudiée notamment

sur la reproduction et le développement des post-larves (Maeda et al. 2008), la dévalaison des larves (Maeda & Tachihara 2010, Yamasaki et al. 2011), la durée de la phase larvaire en mer (Maeda et al. 2007, Shiao et al. 2015), le recrutement (Maeda & Tachihara 2005, Shiao et al. 2015) et leur régime alimentaire (Resh et al. 1999, Maeda & Tachihara 2004). Mais toutes ces études ont été faites à des échelles locales ou régionales, et les espèces de l'Indo-Pacifique ont été peu étudiées sur la globalité de leurs aires de répartition *i.e.*, **aucune étude génétique, ni de phylogénie, ni de phylogéographie, n'ont été effectuées sur le genre ou bien sur l'une de ces espèces**. Bien que, dans le cadre de la gestion et de la conservation de ces dernières, l'étude de la connectivité des populations et de leur dispersion soit essentielle.

Il était donc primordial, de commencer par **réviser le genre *Eleotris* dans l'Indo-Pacifique** avant de réaliser toute étude sur l'une des espèces composant ce genre. C'est ce par quoi nous avons commencé.

Dans le **premier chapitre**, nous traiterons de la méthodologie qui a été utilisée au cours de cette thèse en commençant par la stratégie d'échantillonnage, suivi des problèmes d'identification des espèces d'*Eleotris*. Par la suite, les outils utilisés pour étudier les traits d'histoire de vie des espèces seront présentés à travers l'analyse des otolithes, qui sont de véritable « boîtes noires » de la vie des poissons, et dont nous étudierons la microstructure et la microchimie dans le chapitre 7. Nous finirons par détailler les techniques d'analyses moléculaires qui seront utilisées pour la phylogénie du genre et la phylogéographie de certaines espèces dont nous reparlerons dans le chapitre 5.

Avant toute analyse, un bilan de la taxonomie du genre *Eleotris* dans l'Indo-Pacifique devait donc être réalisé. C'est ce que nous aborderons dans le **second chapitre**. Nous commencerons par faire un rappel de la nomenclature utilisée en taxonomie, suivi d'une mise à niveau de l'état actuel des espèces valides d'*Eleotris* de l'Indo-Pacifique. Cette étude nous permettra de mettre au point une nouvelle clé de d'identification des *Eleotris* adultes et un guide pour identifier certaines post-larves. A partir de cette nouvelle clé d'identification, nous avons pu souligner la présence d'espèces nouvelles. Et la description de l'une d'entre elle fera l'objet du **troisième chapitre**.

Dans un **quatrième chapitre**, la phylogénie des *Eleotris* de l'Indo-Pacifique sera présentée, issue de la combinaison de données moléculaires et taxonomiques (taxonomie intégrative). Deux phylogénies seront réalisées, une première à partir d'un fragment du gène *COI* (585 pb) et une seconde à partir du mitogénome partiel (6 gènes ; 7143 pb).

A la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons au complexe « *fusca* » à large distribution. Dans le **cinquième chapitre**, nous étudierons ainsi la phylogéographie de ce complexe, que nous comparerons ensuite avec celle obtenue pour *E. acanthopoma*, une autre espèce à large répartition. Dans un **sixième chapitre**, nous nous intéresserons de plus près aux différences morpho-méristiques pouvant distinguer les espèces constituant le complexe « *fusca* » ; pour ensuite, pouvoir statuer sur les noms appropriés à chacune d'entre elles. Une fois tout ceci résolu, nous pourrons nous attacher à l'étude de leurs traits d'histoire de vie dans le **septième chapitre**. Grâce aux analyses i- microchimique, nous pourrons valider le cycle amphidrome pour chacune des espèces ; ii- microstructurale, nous pourrons en apprendre davantage sur le temps que les larves auront passé en mer et sur le lien qui unit la croissance de l'otolithe à celle de l'individu.

Enfin, nous finirons l'ensemble par la synthèse de la révision du genre *Eleotris* dans l'Indo-Pacifique à travers le bilan taxonomique et la phylogénie. La phylogéographie et l'étude des traits d'histoire de vie du complexe « *fusca* » nous permettront de discuter de l'impact des événements biogéographiques et de la courantologie sur la répartition des espèces au sein de l'Indo-Pacifique. Ces travaux seront replacés dans un contexte de gestion et de conservation.

Chapitre 1

Méthodologie

I. Stratégie d'échantillonnage

Depuis de nombreuses années, l'équipe 4 « Dispersion larvaire et organisation en milieu austral et insulaire tropical » de l'UMR BOREA 7208 réalise des missions de par le monde, nous permettant d'avoir accès à un grand nombre de spécimens, qui une fois étudiés, sont enregistrés et placés dans les collections du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris. Concernant les milieux insulaires, les campagnes d'échantillonnage ont commencé en 1997 et sont le fruit de nombreuses collaborations. De ce fait, pour cette étude, nous avons bénéficié d'un large échantillonnage d'*Eleotris* (Tableau 1).

Tableau 1 : Campagnes de terrain ayant fournies des *Eleotris*

Année	îles échantillonnées
2001	Polynésie Française
2003	Vanuatu, Mayotte
2004	Nouvelle-Calédonie, Futuna
2005	Mohéli, Anjouan
2006	Vanuatu, Polynésie Française, Nouvelle-Calédonie
2007	Vanuatu, Polynésie Française, Nouvelle-Calédonie, Réunion
2008	Vanuatu, Samoa, Madagascar
2009	Polynésie Française, Mayotte
2010	Vanuatu, Rarotonga, Papua, Nouvelle-Calédonie
2011	Palau
2012	Réunion, Seychelles, Pohnpei
2013	(Okinawa), Fidji, Samoa, Nouvelle-Calédonie
2014	(Philippines), Salomon, Vanuatu
2015	Salomon

Au sein de l'**océan Indien** (superficie de 74 900 000 km²), les archipels et/ou îles échantillonné(e)s sont (Tableau 2) (Fig. 10, Introduction) :

- i. L'archipel des **Seychelles** composé de 41 îles granitiques d'origine continentale (telles que Mahé, Praslin et Digue) et de 74 îles coralliennes formées sur des socles d'origine volcanique.
- ii. L'archipel des **Comores** (au sens large et non politique) qui regroupe les îles d'**Anjouan, Mohéli** et **Mayotte**.

- iii. L'île de la **Réunion** ayant un volcan encore en activité, le piton de la Fournaise. Et, de par sa situation géographique, est plus fréquemment touchée par les cyclones que les Comores et les Seychelles.
- iv. L'île de **Madagascar** qui est l'une des plus grandes îles du monde.

Tableau 2 : Classification des îles échantillonnées dans l'Indo-Pacifique en fonction de leur superficie. Le tableau de gauche concerne les îles de l'océan Indien et celui de droite, celles de l'océan Pacifique.

île	Superficie (km ²)
Mohéli	290
Mayotte	374
Seychelles	410
Anjouan	424
Réunion	2 512
Madagascar	592 000

île	Superficie (km ²)
Rurutu	29
Tubuaï	45
Futuna	46
Rarotonga	67
Ua Huka	83
Moorea	134
Ponhpei	372
Palau	458
Okinawa	1 183
Samoa	2 842
Bali	5 780
Fidji	8 300
Panay	12 011
Vanuatu	12 189
Nouvelle-Calédonie	19 000
Salomon	40 000
Papouasie occidentale	400 000

Aucun océan ne peut rivaliser avec l'**océan Pacifique** (superficie de 179 700 000 km²) et son nombre incalculable d'îles (estimation entre 20 000 et 30 000 îles). Pour notre étude nous avons essayé d'avoir la meilleure couverture géographique possible pour l'échantillonnage des *Eleotris*. Ce sont finalement 17 îles qui ont été prospectées (Tableau 2) (Fig. 10, Introduction) et que l'on peut regrouper de la façon suivante :

- i. L'Indonésie : comprenant l'île de **Bali** et la **Papouasie occidentale**. Cette dernière fait partie de l'île de la Nouvelle-Guinée (environ 800 000 km²) qui est la 2^{ème} plus grande île au monde derrière le Groenland.
- ii. Les Philippines : constituées notamment de l'île de **Panay**. Cet archipel est soumis est fréquemment touché par des typhons et on dénombre en moyenne 15 à 20 cyclones par an (les plus nombreux en août-septembre).
- iii. Le Japon : avec l'île d'**Okinawa** faisant partie de l'archipel des îles Ryūkyū, et contrairement aux autres îles de l'Indo-Pacifique, ces dernières sont de type subtropical.
- iv. La Micronésie : les îles de **Palau** et de **Ponhpei**.
- v. La Mélanésie : les **îles Salomon**¹ à cheval sur deux archipels, celui des îles Salomon (Papouasie Nouvelle-Guinée) et celui des îles Santa Cruz. La **Nouvelle-Calédonie**, l'archipel du **Vanuatu** et les **îles Fidji**.
- vi. La Polynésie : l'archipel de **Futuna**, celui des **Samoa**, l'île de **Rarotonga** appartenant à l'archipel des îles Cook et l'archipel de la Polynésie Française (avec les îles de **Moorea**, **Rurutu**, **Tubuaiti** et **Ua Huka** (Marquises)).

Les campagnes de terrain ont été réalisées avec la technique de la **pêche électrique** à l'aide d'un DEKA 3000 (Gerätebau, Marsberg, Allemagne). Celle-ci est parfaitement adaptée pour les petits cours d'eau des rivières tropicales qui sont ni trop large ni trop profond. Ce procédé consiste à créer un champ électrique dans l'eau entre les deux électrodes, *i.e.* la cathode et anode. C'est autour de l'anode que le champ électrique est émis et son intensité diminue à mesure que l'on s'éloigne de celle-ci jusqu'à devenir nulle à 2 mètres de distance. Le champ électrique créé va stimuler la voie sensitive nerveuse du poisson et inhiber sa voie motrice lorsqu'il le traverse. La nage du poisson se trouve donc inhibée et ce dernier est emporté par le courant ; il sera ensuite récupéré en aval dans les épuisettes. Etant donné que cette méthode de pêche se pratique à pied et que les opérateurs ont tendance à remuer les fonds afin de faire sortir

¹ Depuis peu, deux menaces pèsent sur cet archipel : la montée du niveau marin, qui est largement supérieure à celle de la moyenne mondiale observée, et par l'érosion massive des côtes due aux vagues particulièrement violentes dans ce secteur.

les spécimens les mieux cachés, il est primordial de se déplacer de l'aval vers l'amont afin de laisser l'eau claire tout au long de la pêche. Une fois les individus capturés, i- si l'identification de l'espèce est certaine, l'occurrence est notée et un morceau de nageoire est prélevé et conservé dans l'alcool pur à 95% pour les études génétiques, puis le poisson est relâché vivant ; ii- si le spécimen pêché présente une morphologie ou des caractères jamais observés ou pouvant laisser un doute sur sa détermination, il sera endormi avec de l'essence de clou de girofle à 10% puis sacrifié dans de l'alcool pur à 95% en vue de futures analyses telles que la génétique, la morphométrique et/ou de l'otolithométrie. Chaque spécimen collecté en entier est tagué et un numéro est attribué aux morceaux de tissu collectés sur les spécimens vivants.

A partir de toutes ces missions, nous avons pu bénéficier de près de **690 *Eleotris* entiers, 206 morceaux de tissu et 272 post-larves**. Selon les analyses qui ont été menées au cours de cette étude, des sous-échantillonnages ont été effectués et seront indiqués dans chaque chapitre.

II. Protocole d'identification des espèces d'*Eleotris* sur le terrain

Il est difficile de définir un protocole strict de l'identification des espèces composant le genre *Eleotris* lorsqu'elles sont échantillonnées sur le terrain tant elles sont difficiles à différencier sans loupe binoculaire. Un critère qui pourrait nous permettre de les distinguer est le lieu de capture en fonction du gradient de salinité (de l'estuaire jusqu'en haut du cours d'eau inférieur ou jusqu'à l'obstacle infranchissable pour les Eleotridae). En effet, Maeda & Tachihara (2004) ont montré que certaines espèces ont un préférence pour l'amont ou l'aval des cours d'eau, sur l'île d'Okinawa, avec bien entendu des zones où on les retrouve en sympatrie. Il est ainsi observé que les *E. melanosoma* sont plutôt présents dans les zones de balancement des marées, *i.e.* dans les estuaires et dans les premiers mètres des cours d'eau, les *E. acanthopoma* se trouvent un peu plus en amont et les *E. fusca* seraient encore plus en amont. Mais nous n'avons aucune information sur les autres espèces du genre. Lorsque les cours d'eau sont étroits et courts, il se peut que les espèces vivent entièrement en sympatrie. Lors de la campagne au Vanuatu de Novembre 2014, il nous est en effet arrivés de capturer des *E. fusca* et des *E. acanthopoma* dans la même zone et ce, à seulement quelques mètres de l'estuaire (Fig. 1). Et comme il a été indiqué dans le chapitre introductif, on ne peut se fier aux couleurs des spécimens (Fig. 9, Introduction). Toutefois, elles nous permettent dans certains cas de distinguer deux espèces : une présentant une robe avec deux teintes marrons (*E. fusca*) et une

autre noire (*E. acanthopoma*). Néanmoins, pour identifier les espèces, il faut surtout regarder les **papilles sensorielles** céphaliques qui sont situées sous les yeux et sur l'opercule. Mais ces dernières ne sont visibles que lorsque les spécimens sont mis en alcool, car vivants elles sont masquées par la présence de mucus qui couvre la totalité du corps.

Etant donné la complexité de l'identification des espèces et compte tenu de son importance, cette partie sera entièrement détaillée dans le chapitre suivant qui traitera du bilan de la taxonomie du genre.

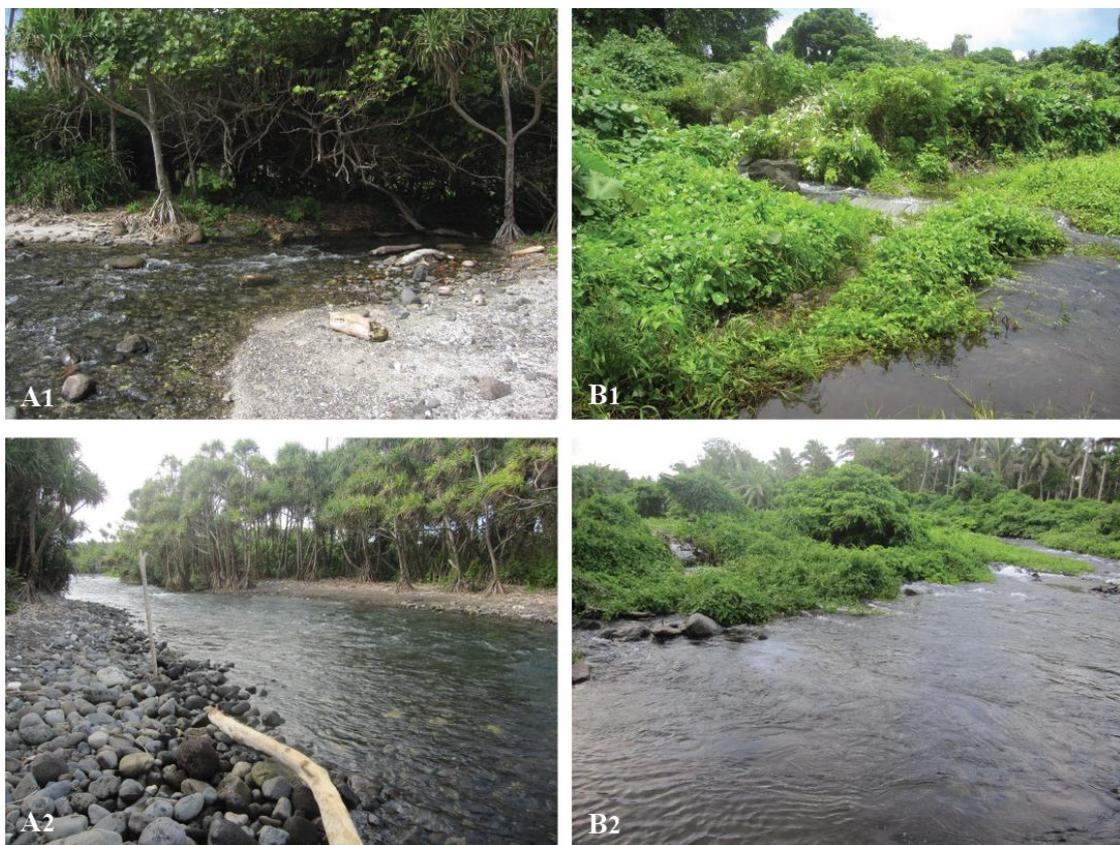


Figure 1 : Exemples d'habitats où des *Eleotris* peuvent être observés – A1 et A2 : deux estuaires ; B1 et B2 : cours d'eau à 500 m des estuaires, beaucoup de végétation propice à la prédation et au camouflage

III. Otolithométrie

1. Les otolithes : la « boîte noire » des Téléostéens

a. La sclérochronologie

La sclérochronologie est une science qui vise à reconstruire l'histoire vécue par les organismes vivants, en étudiant leurs **pièces calcifiées** (Panfili et al. 2002). Elle permet non seulement l'estimation de l'âge mais aussi l'estimation de la période et de la durée d'événements marquants de l'histoire individuelle des poissons. Chez les Téléostéens, les pièces calcifiées montrent des patrons de structures liés aux variations du taux de croissance induits par des facteurs environnementaux (biotiques ou abiotiques) et des facteurs endogènes (événements ontogéniques) (Panfili et al. 2002). Trois types principaux de structures sont classiquement utilisés en sclérochronologie (Fig. 2) : les écailles (scalimétrie), les os (squelettochronologie) et les otolithes (otolithométrie).

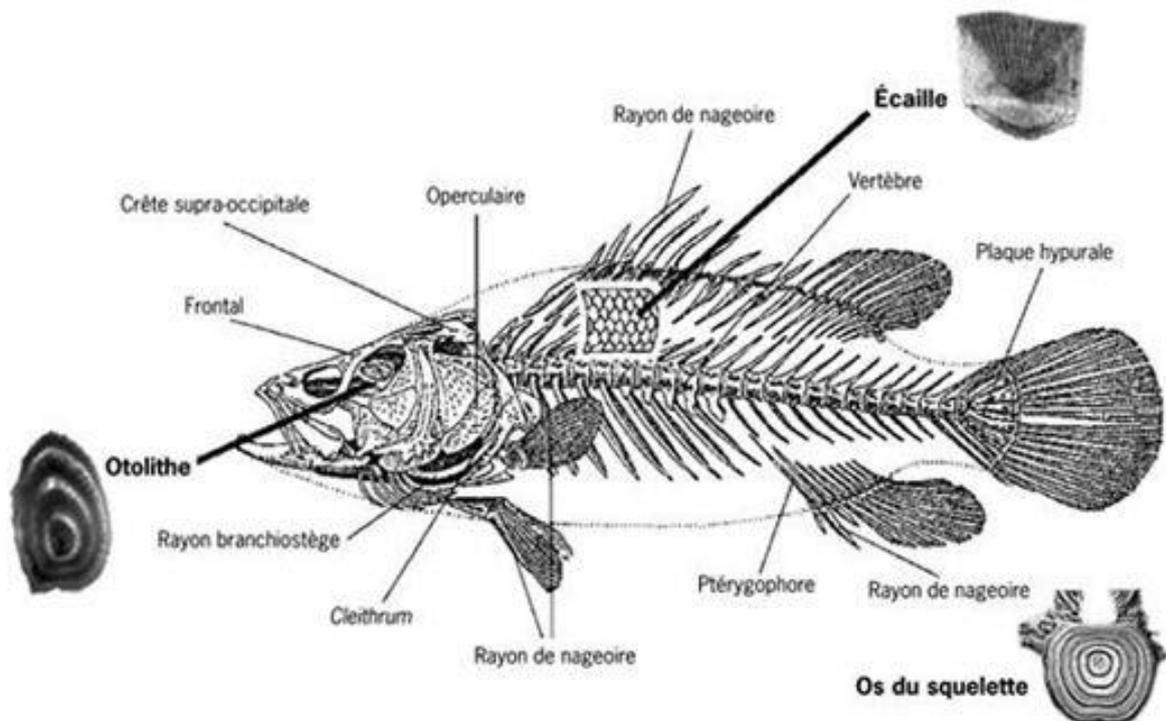


Figure 2 : Illustration des différentes pièces calcifiées pouvant être utilisées dans les études de sclérochronologie ainsi que les trois principaux types de structure étudiés (otolithe, écaille, squelette) (d'après Panfili et al. 2002)

b. Position anatomique des otolithes

Les otolithes (du grec « oto » : l'oreille et « lithos » : la pierre) sont des concrétions minéralisées situées dans **l'oreille interne** des poissons Téléostéens, de manière symétrique de part et d'autre de l'encéphale, en arrière des yeux. La membrane otoconiale de l'oreille interne se compose de trois canaux semi-circulaires qui se terminent chacun par un sac, le *sacculle*, l'*utricule* et la *lagena* renfermant respectivement un otolithe la *sagitta*, la *lapillus* et l'*astericus* (Fig.3).

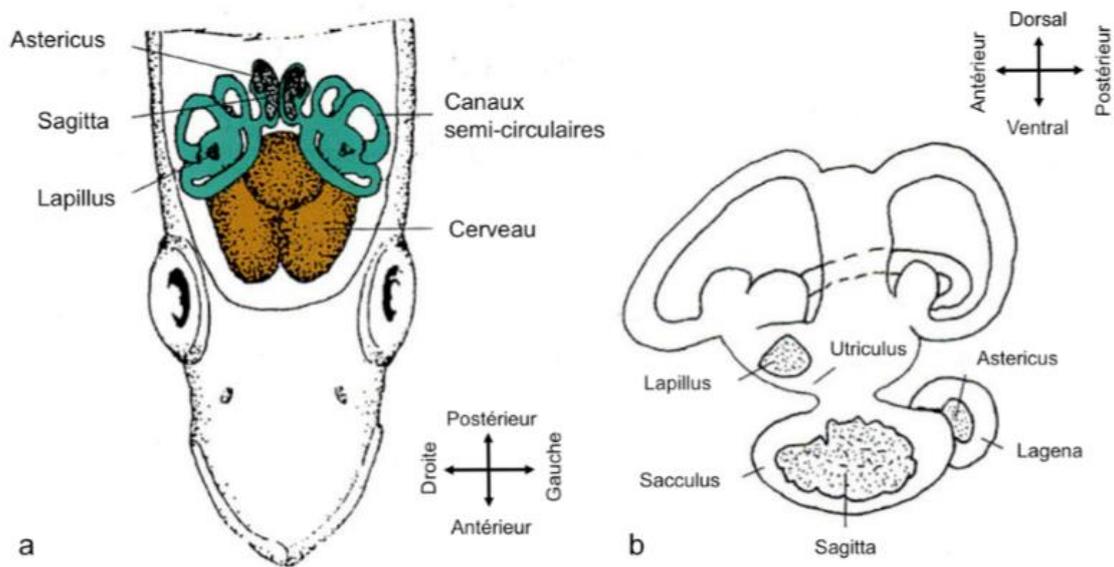


Figure 3 : Position des 3 paires d'otolithes à l'intérieur de l'oreille interne des Téléostéens
a : vue dorsale de l'appareil vestibulaire ; b : vue depuis les 3 canaux semi-circulaires
(modifié d'après Secor et al. 1992).

c. Fonction et composition des otolithes

Les **otolithes** offrent un avantage par rapport aux autres pièces calcifiées, ce sont des structures qui sont **métaboliquement inertes**, c'est-à-dire qui ne semblent pas sujettes à des résorptions minérales ou à des remaniements (Campana & Thorrold 2001). Cette propriété permet d'utiliser les otolithes pour reconstituer de nombreuses informations sur le passé environnemental et physiologique du poisson. En effet, ils sont présents dès l'éclosion des larves (présence du nucléus) et participent à l'ensemble des fonctions de l'oreille interne :

réception des signaux acoustiques, réponse aux forces d'inertie et de gravité (Baglinière et al. 1992, Lecomte-Finiger 1999).

Ces pièces calcifiées sont constitués d'**aragonite**, forme cristallisée du **carbonate de calcium** (CaCO_3), fixée sur une matrice organique composée largement d'une protéine proche de la kératine : l'otoline (Watabe et al. 1982, Morales-Nin 1987). La formation de l'otolithe se fait par addition de couches concentriques de carbonate de calcium appelées « zones-L » (zones claires) et de couches protéiques appelées « zones-D » (zones sombres), leur donnant ainsi une structure quelque peu comparable à celle d'un bulbe d'oignon (Fig. 4) ; et elle s'étale sur une échelle de temps allant d'un rythme journalier à un rythme annuel (Panfili et al. 2002). Les premiers dépôts (ou stries) journaliers commencent généralement lorsque la bouche s'ouvre et que la larve commence à s'alimenter (Panfili et al. 2002). Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine des dépôts annuels tels que les variations de température, la reproduction, des différences de salinité des eaux liées aux déplacements des individus le long du cours d'eau ou aussi la fluctuation de la ressource alimentaire. En plus de ces facteurs externes influençant la croissance et la composition des otolithes, il faut aussi prendre en compte les facteurs internes liés au métabolisme de l'individu tels que le taux d'hormones et le rythme circadien endogène.

Concernant les espèces diadromes, des zones (ou marques) composées de stries très rapprochées sont visibles à certains endroits de l'otolithe (en fonction de l'âge du spécimen) et sont liées à des moments clés du cycle de vie tels que le recrutement et la métamorphose de l'individu (Reveillac et al. 2008, Lord et al. 2010, Feutry et al. 2012, Taillebois et al. 2012, Teichert 2014). Les *Eleotris* ne présentant pas de métamorphose lors du passage en eau douce, la seule **marque importante** la plus visible est celle **liée au recrutement**. Ainsi, il est facile d'observer la zone correspondant à la vie larvaire en mer de celle adulte en eau douce, chacune de part et d'autre cette marque (Fig. 4). Le calcul du nombre de stries séparant le nucléus de cette marque de recrutement, nous permet d'avoir une estimation sur le temps qu'aura passé la larve en mer et donc sur la **durée de la phase larvaire marine (DPL)**. Celle-ci sera étudiée pour différentes espèces d'*Eleotris* dans le chapitre 4.

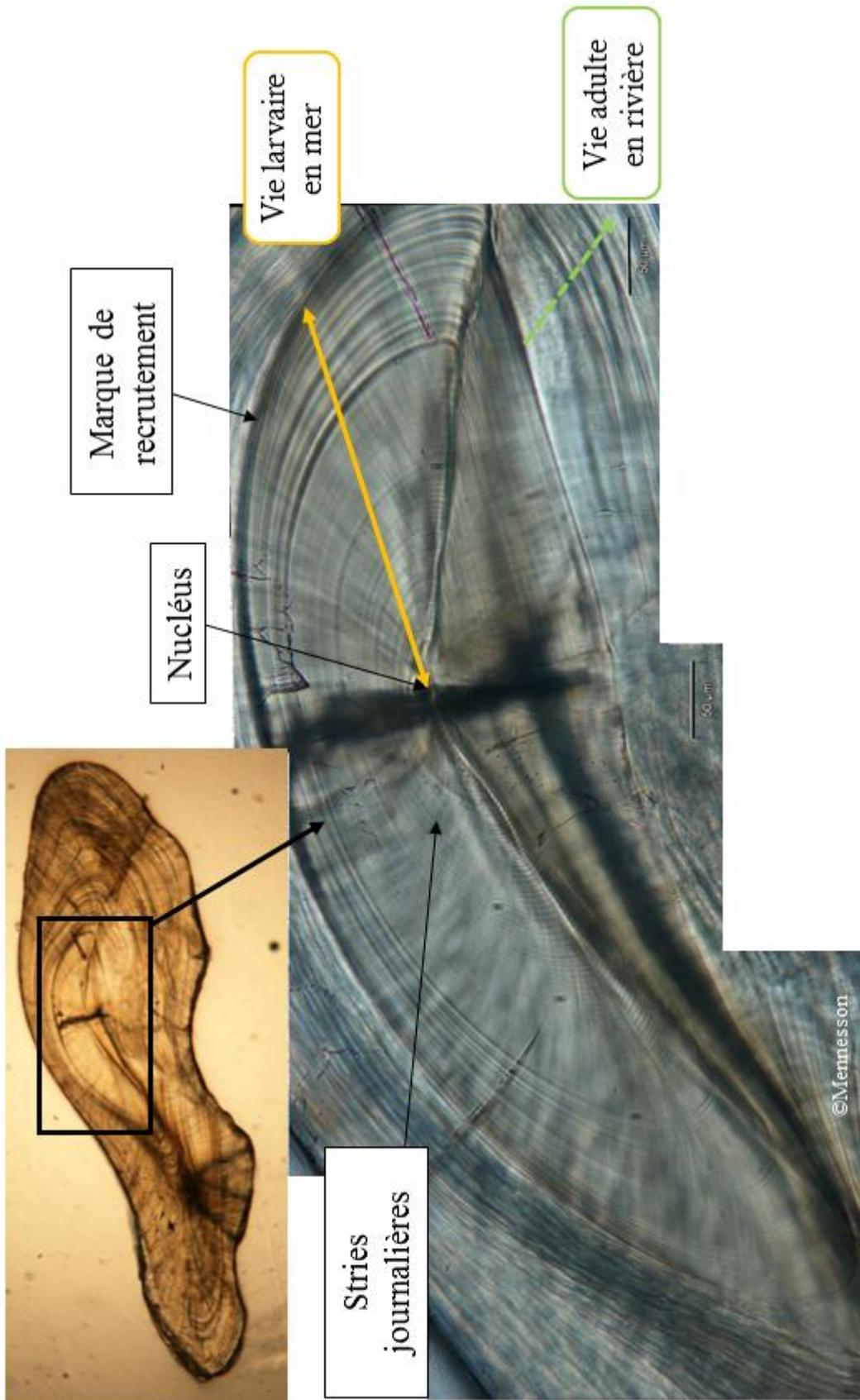


Figure 4 : Coupe transversale d'un otolithe d'*Eleotris fusca*.
 Visualisation de la microstructure.

Bien que les otolithes soient majoritairement composés de carbonate de calcium (CaCO₃), ils contiennent aussi 31 éléments en quantité différente : i- les éléments majeurs (>100 µg.g⁻¹ de Ca, C et O) ; ii- les éléments mineurs (<100 µg.g⁻¹ de Cl, Fe, K, Na, P, S et Sr) ; et les éléments traces (<10 µg.g⁻¹ de Ag, Al, As, B, Ba, Br, Co, Cd, Cs, Cu, Hg, Li, Mg, Mn, N, Ni, Pb, Se, Si, U et Zn). Tous ces éléments, issus du milieu environnant, passent successivement dans le plasma sanguin puis dans l'endolymphe et ce, principalement par voie dissoute, *i.e.* par les branchies ou par absorption de l'eau (Campana 1999). Du fait de ces passages, les éléments incorporés dans les otolithes présenteront des concentrations différentes de celle qu'ils ont dans l'eau. Des études menées sur l'affinité des éléments Sr, Fe, Ba, Mn, Pb et Zn suggèrent que leur abondance relative dans l'environnement pourrait être reflétée dans les otolithes (Campana et al. 2000, De Pontual & Geffen 2002, Elsdon & Gillanders 2006). De plus, il a été démontré que la proportion assimilée d'un ion, quel qu'il soit, augmente lorsque la concentration en calcium diminue ; ce qui nous permet d'utiliser le rapport élément sur calcium (élément:Ca) afin d'obtenir des indications pour tracer l'environnement de l'individu (Campana 1999).

d. Lien entre les ratios élémentaires et l'amphidromie

Étant donné que les otolithes ne sont pas sujets à résorption minérale, l'étude de leur microchimie permet de reconstruire l'histoire migratoire et environnementale des poissons (Daverat et al. 2005, Shiao et al. 2006 & 2015, Arai et al. 2007, Lord et al. 2011). C'est le rapport strontium sur calcium (Sr:Ca) qui est le plus couramment utilisé pour reconstruire les comportements migratoires des espèces diadromes entre les eaux salées des océans/mers et les eaux douces des fleuves/rivières (Milton et al. 2008, Tabouret et al. 2010, Feutry et al. 2011, 2012). En effet, les concentrations en Sr sont stables et beaucoup plus élevées en milieu marin (Sr = 8000 µg.l⁻¹) qu'en milieu dulçaquicole (Sr = 60 µg.l⁻¹) (De Pontual & Geffen 2002). Pour les espèces amphidromes, un rapport élevé de Sr:Ca dans les otolithes est largement accepté comme une preuve d'occupation d'un habitat marin (Howland et al. 2001, Crook et al. 2006) ou d'une phase larvaire marine (Closs et al. 2003) alors qu'un rapport faible reflète l'occupation d'un habitat d'eau douce. De nombreuses études ont été menées pour observer les comportements migratoires des poissons, qu'ils soient anadromes (ex : *Alosa spp.* [Limburg et al. 2003]), catadromes (ex : *Kuhliidae* [Feutry et al. 2011], *Anguillidae* [Tabouret et al. 2010])

ou amphidromes (Sicydiinae [Tabouret et al. 2011, Lord et al. 2011, Taillebois et al. 2015]). De plus, chaque rivière possède ses propres rapports d'éléments et bien entendu, ils évoluent en fonction de l'amont et de l'aval mais aussi de l'environnement et des crues. Ainsi, des *Eleotris* capturés en aval des cours d'eau ne présenteront pas le même rapport de Sr:Ca que les Sicydiinae (Gobiidae) en amont et que d'autres *Eleotris* issus de localités différentes. Cependant, un schéma est retrouvé chez toutes les espèces amphidromes : du nucléus à la marque de recrutement (*i.e.*, zone de l'otolithe correspondant à la vie larvaire en mer), le rapport Sr:Ca est très élevé, une fois passé au niveau de la marque de recrutement (*i.e.* arrivée de la post-larve dans l'estuaire), le rapport chute et va ensuite diminuer jusqu'à atteindre un plateau lorsque l'adulte sera installé dans la rivière.

Les otolithes apparaissent donc comme étant de véritables « boîtes noires » où s'inscrivent non seulement l'âge mais aussi un grand nombre d'événements marquants dans la vie de l'individu tels que la résorption du sac vitellin, le changement d'habitat et le temps passé dans les différents habitats. Ils permettent aussi de valider le type de migration qu'effectue chaque individu au cours de sa vie et de ce fait, de valider le cycle de vie diadrome : anadrome, catadrome ou amphidrome de l'espèce étudiée. Nous nous intéresserons à la microchimie des otolithes d'*Eleotris* dans le chapitre 4.

2. Estimation de la durée de la phase larvaire

a. Extraction des otolithes

Seules les paires de *sagitta* des spécimens retenus sont prélevées, ce sont les pièces calcifiées les plus grandes et les plus volumineuses, elles sont donc plus faciles à manipuler (Panfili et al. 2002). Pour ce faire, une section frontale de la partie supérieure du crâne est effectuée : il faut ôter la peau située au-dessus du crâne ainsi que la boîte crânienne à l'aide d'un scalpel et d'une pince. Les cavités otiques sont visibles, elles sont positionnées à la base du crâne vers la partie postérieure de la cavité contenant le cerveau et latéralement par rapport à l'axe principal du poisson (Fig. 5). La paire de *sagitta* est prélevée à l'aide de pinces fines. Une fois les otolithes enlevés, ceux-ci sont nettoyés à l'eau distillée ou MilliQ pour éliminer les restes de tissus. Puis, chaque otolithe est séché et conservé dans un tube Eppendorf avec

pour annotation le numéro du tag du spécimen ainsi que la mention « D » pour droit et « G » pour gauche. Les otolithes seront ensuite inclus (Fig. 6).

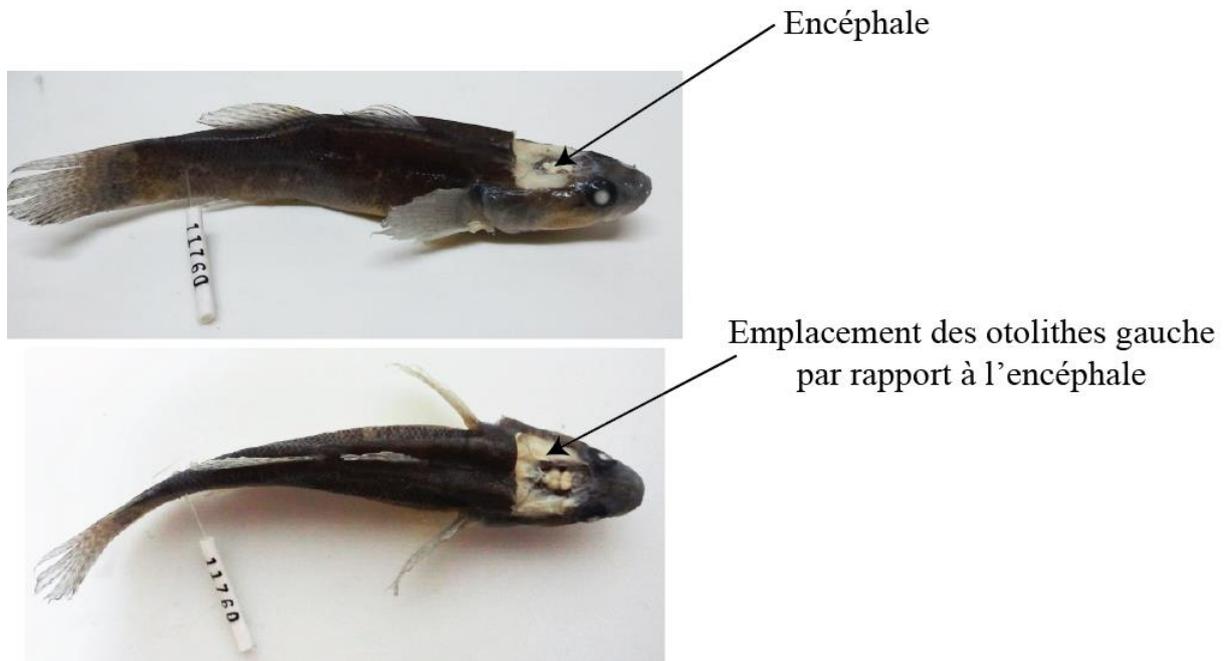


Figure 5 : Spécimens d'*Eleotris fusca* (tag n°11760) scalpé avec l'encéphale visible. Les 3 paires d'otolithes se trouvent de part et d'autre de l'encéphale. © Mennesson

b. Inclusion des otolithes

Pour faire une inclusion, l'utilisation d'une résine est nécessaire. La réalisation de cette dernière se fait par le mélange de la base (Araldite® 2020A, Huntsman) avec le durcisseur (2020B), une fois effectué, il faut laisser le mélange reposer entre 10 et 15 min ou bien utiliser une pompe à vide afin que les bulles d'air soient éliminées.

Sur une lame de verre, les otolithes sont maintenus à l'aide de cales (petits morceaux de résine) afin qu'ils restent en position transversale ; pour une meilleure fixation, un bout de scotch double face est au préalable déposé sur la lame. Une fois l'otolithe fixé, une gélule vide en gélatine (Cooper), ouverte des deux côtés, est placée sur la lame de verre de manière à ce que la pièce calcifiée soit en son centre (Fig. 6). Une fois l'otolithe maintenu, la résine peut être déposée dans les « puits », il faut ensuite attendre 24h pour que la résine sèche. Il faut ensuite se débarrasser de la capsule qui entoure le cylindre de résine en laissant celle-ci se dégrader

dans de l'eau distillée. Au fur et à mesure que les cylindres contenant les otolithes sont obtenus (parfaitement secs), le numéro correspondant à l'otolithe y est inscrit.

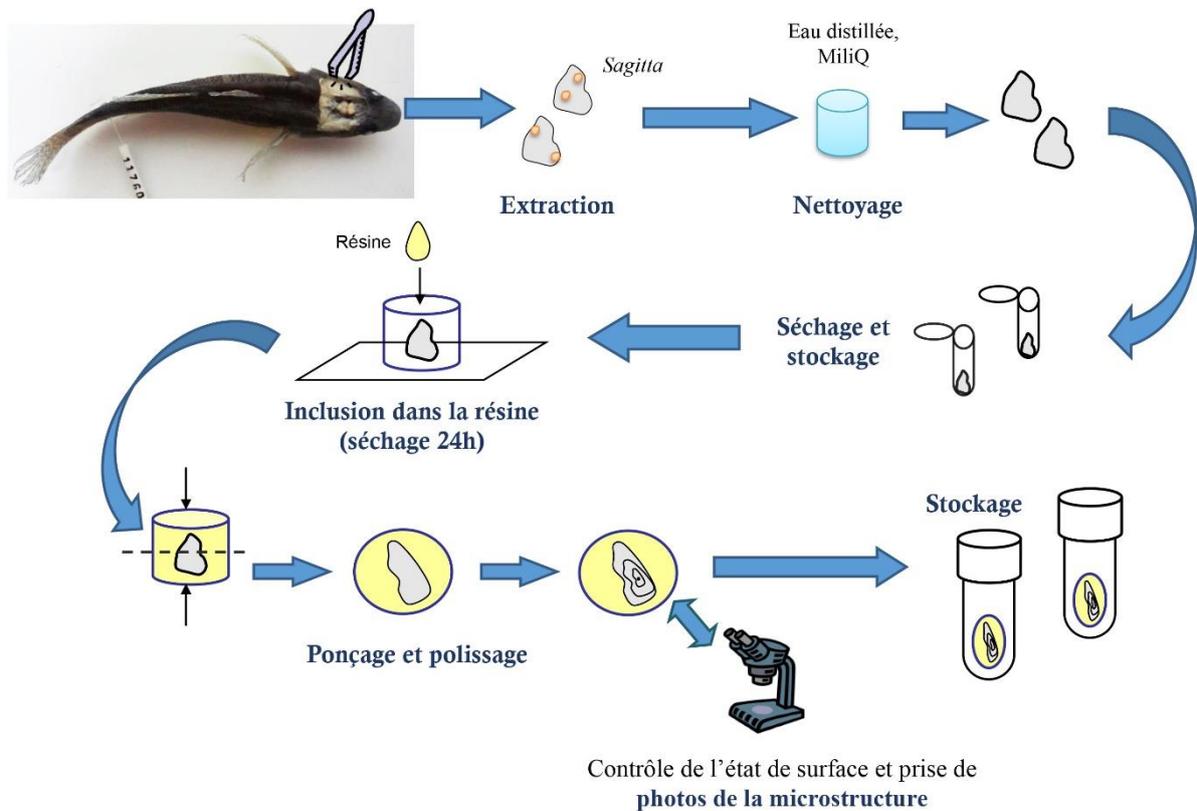


Figure 6 : Schématisation du protocole d'otolithométrie employé

c. Ponçage

Une fois les cylindres de résine obtenus, la phase de ponçage, selon le plan transversal (Fig. 7), de l'otolithe peut commencer.

À l'aide d'une scie à diamant Isomet® 400 (Buehler), l'excédent de résine ne contenant pas l'otolithe est enlevé. La pastille de résine contenant ce dernier est fixée sur une lame de verre (où le numéro du spécimen et la lettre « D » (droit) ou « G » (gauche) figurent) grâce à une colle spéciale (Crystal bond 509 (Escil)). Ensuite, la pastille de résine est poncée à l'aide d'une ponceuse MetaServ® 3000 (Buehler) ou/et à la main en effectuant des « 8 » sur des disques de carbone de silicium (Escil) de granulosités décroissantes. Lorsque l'otolithe est correctement poncé (nucléus apparent ainsi que les stries journalières (Fig. 4)), la dernière étape délicate est celle du polissage qui se fait à l'aide d'un disque de feutre (Escil) et de poudre

d'alumine (Escil) permettant d'enlever toutes rayures gênantes pour la lecture des stries. L'observation de celles-ci est réalisée au microscope Olympus BX51 et chaque coupe d'otolithe est photographiée à l'aide de la caméra *DP20 Olympus* et du logiciel *AnalysisWork*.

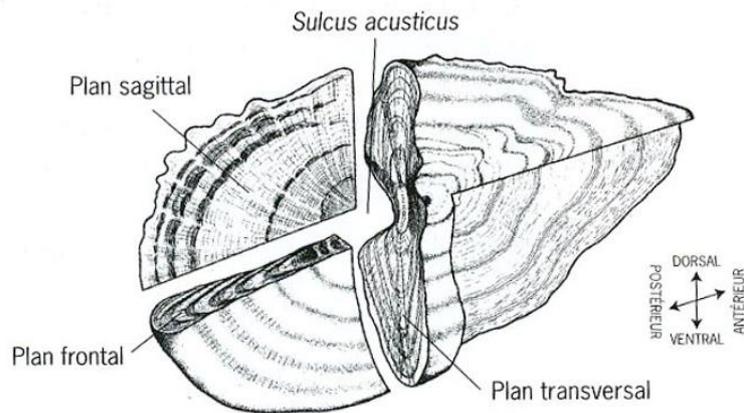


Figure 7 : Différents plans de coupe d'une *sagitta* (d'après Pannella 1980)

d. Estimation de la durée de la phase larvaire

Le logiciel *PTGui* (version 7.2 New House) permet de mieux visualiser la microstructure des otolithes en créant des images panoramiques (cf. la photo zoomée de la Fig. 4) des photos réalisées après le ponçage. Ensuite, via *Photoshop CS3* (Adobe), les stries journalières sont comptées en partant du nucléus jusqu'à la marque de recrutement ; pour ce faire, des points de couleur sont déposés sur chaque strie blanche (« zones-L ») (Fig. 8). La longueur du rayon le plus grand de l'otolithe est aussi mesurée en prenant pour centre le nucléus.

Dans le but d'acquérir une détermination précise de la durée de la phase larvaire et d'éviter les erreurs de lecture, deux lecteurs ont effectué les comptages de stries de façon indépendante ; par la suite, les tests statistiques permettront de vérifier si les différences observées dans les résultats sont significatives ou non.

Pour obtenir le taux de croissance ($\mu\text{m}/\text{jour}$) de l'otolithe durant la phase larvaire, les distances séparant 10 stries sont mesurées de 10 en 10 jusqu'à la marque de recrutement et ce, toujours en partant du nucléus.

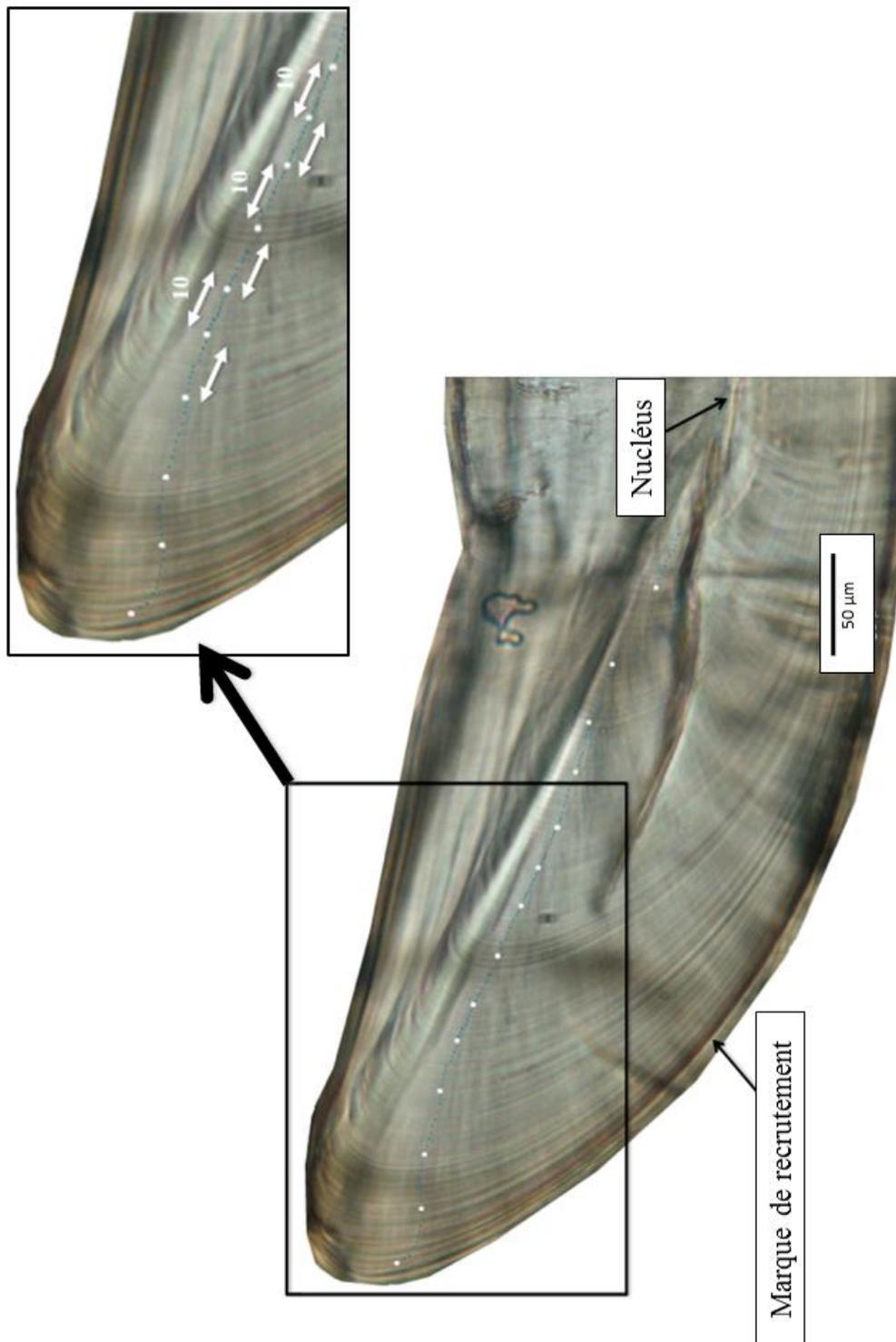


Figure 8 : Analyse du taux de croissance de l'otolithe chez *E. fusca*, un point blanc est apposé toutes les 10 stries. © Mennesson

e. Validation microchimique de la phase larvaire marine et de l'amphidromie

Pour caractériser les comportements migratoires, les ratios Sr:Ca sont mesurés dans les otolithes, grâce au couplage ablation laser femtoseconde - spectromètre de masse à plasma induit (fs-LA-ICP-MS : femtosecond Laser Ablation Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer). Cette technique d'analyse est multi-élémentaire, elle permet d'analyser 40 à 60 éléments simultanément de par ses performances en terme de sensibilité, sélectivité, et rapidité.

Cette méthode d'analyse consiste à envoyer une grande quantité d'énergie lumineuse (longueur d'onde : ultraviolet à infrarouge), focalisée à la surface du matériau à analyser (taille de 10 à 500 μm) avec une impulsion très rapide. Au contact du faisceau laser, de la matière va s'arracher et se volatiliser. Elle sera ensuite analysée, sous forme d'aérosol, par ICP-MS. Cette technique, de haute résolution spatiale, permet de travailler sur des échantillons de très petites dimensions (μm). Le confinement de l'ablation sur une surface réduite donne accès à des informations spatiales sur la distribution des éléments analysés (Günther et al. 1999, Liu et al. 2004).

L'otolithe est placé dans la cellule d'ablation. Le laser femtoseconde émet une source lumineuse de type Infra Rouge. L'énergie du laser est délivrée en quelques femtosecondes et la matière est éjectée du matériau sans diffusion de chaleur dans l'échantillon. L'avantage de cette ablation dite « froide », est qu'elle altère peu l'échantillon et que la zone d'ablation reste nette. L'aérosol produit par cette dernière est véhiculé par l'hélium (He) jusqu'à l'ICP-MS. Les particules volatilisées sont fines ($< 200 \text{ nm}$) et sont alors atomisées de manière efficace dans le plasma de l'ICP-MS, permettant une analyse très sensible (Fig. 9).

Plusieurs stratégies d'ablation sont envisageables avec le laser femtoseconde (Tabouret, 2009) et, dans le cas des otolithes d'*Eleotris fusca*, la stratégie dite 1Dscan, à savoir une ablation fine (20 μm de largeur) réalisée d'un bord à l'autre de l'otolithe en passant par le nucléus, permettra d'obtenir des profils élémentaires continus, couvrant l'ensemble de la vie des individus étudiés. Les conditions d'analyses seront les mêmes que celles décrites par Tabouret et al. (2011). Pour le rapport Sr:Ca (exprimé en μg de Sr par g de Ca), les concentrations en Sr en eau de mer sont 5 fois plus importantes qu'en eau douce. L'étude de ce rapport nous permettra de valider l'amphidromie avec le passage eau de mer - eau douce et la marque de recrutement. Ceci sera abordé dans le chapitre 4.

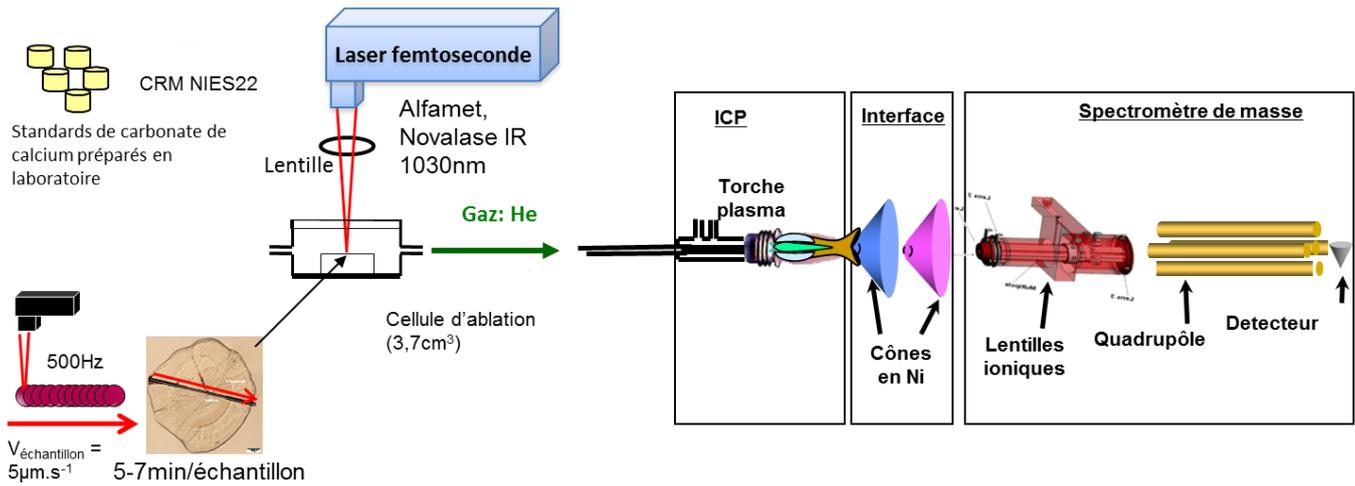


Figure 9 : Schéma du laser femtoseconde LA-ICP-MS (Tabouret 2009)

IV. Analyses moléculaires

1. Avant-propos : Evolution des techniques de séquençage moléculaire

Au cours de cette thèse, **deux méthodologies distinctes de séquençage de l'ADN** ont été effectuées. La 1^{ère} est la **méthode « Sanger »** qui est la plus usitée au monde et qui a vu le jour dans les années 1970. Elle convient parfaitement à l'approche du « Barcoding of Life » (Hebert et al. 2003), qui est couramment utilisé pour l'identification taxonomique des organismes, ainsi qu'au séquençage de fragments de gènes nucléaires. Cependant, cette méthode présente certaines limites : i- un faible rendement, ii- les étapes de préparation de l'échantillon d'ADN, le fractionnement en morceaux de taille lisible ainsi que l'amplification sont lentes et coûteuses, iii- la taille des séquences est limitée (< 800 pb). Au cours des années, les méthodes de séquençage d'ADN ont évolué, les techniques deviennent de plus en plus performantes mais aussi accessibles à un plus grand nombre de scientifiques, offrant de plus larges perspectives pour l'avenir de la génomique. Ainsi, de nos jours, on parle de **méthode « NGS »** c'est-à-dire de Séquençage Nouvelle Génération à haut débit. Les points forts de ces nouvelles technologies sont qu'elles permettent de diminuer les coûts mais aussi d'améliorer le rendement des séquençages (Hinsinger et al. 2015), *i.e.* dans notre cas, obtenir un important jeu de données en seulement un séquençage composé de gènes mitochondriaux entiers (~ 16 000 pb) et de longs fragments de gènes nucléaires (> 1000 pb). Au sein du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris, nous avons eu la chance de pouvoir accéder à cette nouvelle technologie grâce au Service de Systématique Moléculaire (SSM) qui a investi dans un séquenceur haut débit (Ion Torrent) en 2014.

Ainsi, dans un premier temps, la méthode « Sanger » nous a permis d'identifier, en liaison avec la morpho-méristique, la totalité des spécimens collectés en notre possession avec l'utilisation d'un fragment (805 pb) du gène mitochondrial *COI*. Avec ce premier jeu de données, nous avons pu réaliser une première phylogénie des *Eleotris* ainsi qu'une étude phylogéographique de l'espèce *E. fusca*. Par la suite, nous avons choisi d'approfondir notre jeu de données, pour répondre à un certain nombre de questions émises à partir de nos premiers résultats, en séquençant : i- le mitogénome complet (ou génome mitochondrial), nous donnant ainsi accès à plus de 16 000 pb d'information, ii- un fragment du gène nucléaire de la Rhodopsine (*Rh*). De cette 2^{ème} analyse, nous obtenons des résultats plus robustes pour la **phylogénie** et la **phylogéographie des *Eleotris*** qui seront abordées dans les chapitres 3 & 5.

2. Les marqueurs moléculaires utilisés

Lorsque des analyses génétiques sont réalisées, le choix des marqueurs moléculaires employés est important car selon l'échelle à laquelle nous voulons effectuer les analyses (ex : échelle de la famille, du genre, de l'espèce ...) certains ne nous donneront aucune information ou pas du tout les mêmes informations.

En 1987, Avises et al. proposent plusieurs critères pour choisir les meilleurs marqueurs afin d'établir des comparaisons de séquences nucléotidiques homologues entre une grande variété d'organismes. Ainsi, le marqueur moléculaire doit être : i- fortement conservé et universellement distribué au sein d'une large gamme d'organismes, ii- facile à isoler et doit avoir une structure génétique simple, dénuée d'éléments transposables, de pseudogènes et de séquences répétées ou introniques et iii- informatif au niveau spécifique et populationnel et doit donc présenter un taux d'évolution rapide.

En **taxonomie moléculaire**, ce sont les **marqueurs mitochondriaux** qui sont principalement utilisés. En effet, d'une manière générale, les **marqueurs nucléaires** et les marqueurs mitochondriaux **n'évoluent pas à la même vitesse**, ces derniers évoluent plus rapidement et donc plus variables (Brown et al. 1979, Vawter & Brown 1986, Galtier et al. 2009) ; ce qui nous permet d'étudier des relations plus récentes qu'avec les marqueurs nucléaires qui sont moins variables mais avec lesquels nous pouvons observer des spéciations

anciennes. De plus, le génome mitochondrial, haploïde, non recombinant, circulaire et présent en plusieurs copies, est hérité uniquement de la mère, le père ne donne que son ADN nucléaire lors de la fécondation (Zhang & Hewitt 1996). De ce fait, avec le génome mitochondrial, nous avons accès à un génome qui est plus facile à analyser (absence de séquences hétérozygotes) mais qui ne nous donne accès qu'à une partie du patrimoine génétique de l'individu, celui issu de la mère. Pour inférer des relations phylogénétiques à différentes échelles, il est donc fortement recommandé d'associer des gènes mitochondriaux à des gènes nucléaires (Miya et al. 2007, Pante et al. 2015a). Ceci permettant de donner plus de poids à certains résultats comme nous le verrons dans le chapitre traitant de la phylogéographie d'*E. fusca*.

a. Le marqueur mitochondrial « classique » : le gène *COI*

En 2003, Hebert et al. proposent une nouvelle approche pour l'identification moléculaire : le « Barcoding of Life » ou « code-barres » moléculaire. Elle consiste à comparer une séquence ADN donnée avec celles obtenues avec le même marqueur utilisé dans la base de données de référence BOLDSYSTEMS (Barcode Of Life Data Systems, www.boldsystems.org). Pour un grand nombre d'animaux, c'est un **fragment du gène mitochondrial *COI*** codant pour la 1^{ère} sous-unité de la Cytochrome Oxydase I (une enzyme de la chaîne respiratoire) qui est utilisé. Ce gène présente une variabilité intraspécifique supérieure à celle interspécifique dans une majorité de groupes taxonomiques dont les Téléostéens (Ward et al. 2005, Ward et al. 2009) ; ceci lui conférant des propriétés intéressantes pour réaliser des phylogénies et de la génétique des populations.

Cette méthode de « barcoding » implique que les spécimens provenant d'une même espèce possèdent des séquences très proches et inversement, s'ils sont issus d'espèces différentes. L'identification des spécimens séquencés peut ensuite être vérifiée grâce à la base de données de référence. Cependant, elle manque de variabilité chez certains groupes (Dettai et al. 2011, Geiger et al. 2014) et bien qu'elle soit pratique pour avoir un premier aperçu de l'identification taxonomique des spécimens échantillonnés sur le terrain, elle reste limitée et doit être couplée à d'autres marqueurs moléculaires.

b. Le gène de la rhodopsine (Rh)

Chez les vertébrés, il existe 5 groupes de pigment protéique photosensible qui sont codés par 5 gènes paralogues, *i.e.* ces gènes ont évolué à partir de la duplication d'un même gène de départ qui était présent chez l'ancêtre commun des vertébrés (Yokoyama et al. 1999). Parmi ces 5 gènes se trouve celui de la rhodopsine (*Rh*) qui code pour un pigment du même nom. Chez les Téléostéens, le rétrogène (*i.e.* gène se réintégrant dans l'ADN à la suite d'une transcriptase inverse) de la rhodopsine est communément utilisé pour la taxonomie moléculaire dans la construction de phylogénie à moyenne et à grande échelle (Chen et al. 2003, 2007, 2008, Sevilla et al. 2007, Lautrédou et al. 2010, Collins et al. 2012, Rehbein 2013).

c. Le génome mitochondrial complet : mtDNA

De nombreux marqueurs mitochondriaux (*COI*, *Cytb*, *12S* et *16S*) ont été employés pour reconstruire l'évolution des espèces depuis les années 90 ; ce qui a permis de reconstruire les relations parentales de très nombreux groupes. Depuis peu, l'utilisation du gène *COI* est considérée par certains scientifiques comme dépassée et pas assez pertinente (Taylor & Harris 2012, Downton et al. 2014). De plus, les jeux de données incluant le mitogénome complet sont compatibles avec la plupart des marqueurs publiés dans les études au fil des années, les gènes mitochondriaux étant très populaires. D'autant plus que les jeux de données de mitogénomes ont été employés avec succès et de manière répétée sur de nombreux groupes de Téléostéens (Miya & Nishida, 2015). Chez ces derniers, ce génome circulaire mesure environ 16 000 pb et est composé de 13 gènes codants, 2 ARNr (*12S* et *16S*) et 22 ARNt (Fig. 10). Chez les Eleotridae, l'ordre des gènes est conservé (Miya et al. 2003, Wei et al. 2013, Xia et al. 2015, Perini et al. 2016, Zang et al. 2016).

débris cellulaires. Les traces d'éthanol sont éliminées lors du séchage de la plaque par aspiration. Pour finir, l'ADN est élué par ajout de tampon Tris-Hcl et est conservé à -20°C.

4. Amplification des fragments de gène et/ou d'un gène entier à partir de l'ADN génomique total

L'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) a pour objectif de sélectionner une zone précise du génome à partir d'amorces spécifiques, permettant ainsi d'obtenir une grande quantité de fragments d'ADN correspondant à cette zone. Les amorces qui ont été utilisées ont déjà été décrites dans la littérature (Tableau 3).

Tableau 3 : Amorces utilisées pour l'amplification

Gène	Nom des amorces	séquence (5'-3')	Auteurs
<i>COI</i>	Tel F1	TCGACTAATCAYAAAGAYATYGGCAC	Dettai et al., 2011
<i>COI</i>	Tel R1	ACTTCTGGGTGNCCAAARAATCARAA	Dettai et al., 2011
Complete mitogenome	12S-L1091R	AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT	Kocher et al., 1989
Complete mitogenome	MtH7061	GGGTTATGTGGCTGGCTTGAAC	Hinsinger et al., 2015
Complete mitogenome	MtL5231	TAGATGGGAAGGCTTCGATCCTACA	Hinsinger et al., 2015
Complete mitogenome	MtH11944	CATAGCTTTTACTTGGATTTGCACCA	Hinsinger et al., 2015
Complete mitogenome	MtL11910	CAGCTCATCCATTGGTCTTAGGAAC	Hinsinger et al., 2015
Complete mitogenome	12S-H1478	TGACTGCAGAGGGTGACGGCGGTGTGT	Hinsinger et al., 2015
<i>Rh</i>	F193	CARTGGTGCTACCTSTGCGA	Chen et al., 2003
<i>Rh</i>	R1039	CGTGGTCYTTCKGAAGCG	Chen et al., 2003

a. Amplification des fragments courts : gènes *COI* et *Rh*

Les PCR sont réalisées dans un volume total de 20 µL avec 2 µL de tampon, 1 µL de DMSO (DiMéthyl SulfOxyde), 1 µL de BSA (Sérum d'Albumine Bovine), 0,8 µL d'un mélange dNTP (DésoxyNucléotide TriPhosphate), 0,32 µL de chaque amorce forward et reverse, 0,06 µL de TAQ (ADN polymérase recombinante, Qiagen). Le volume restant est de l'eau.

L'amplification de l'ADN se fait à l'aide d'un thermocycleur (Biometra® ou Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler). Le programme de PCR est constitué de plusieurs étapes et est le même pour les deux fragments *COI* et *Rh* :

- i. Dénaturation initiale (2 min à 94°C) suivie de 55 cycles pour les 2 gènes comprenant les étapes 2,3 et 4
- ii. Dénaturation (25 s à 94°C)
- iii. Hybridation des amorces (25 s à 54°C)
- iv. Elongation (55 s à 72°C)
- v. Elongation terminale (2 min à 72°C)

Une électrophorèse sur gel d'agarose (40 mL de TAE (Tris-acetate-EDTA), 0,8 g d'agarose ; 0,8 µL de Bet (un agent intercalant de l'ADN : Bromure d'Ethydium)) est réalisée afin de visualiser les produits de la PCR. Dans chaque puits du gel est déposé : 3 µL de chaque produit de PCR, 3 µL de témoin (PCR sans ADN) et 1,2 µL de marqueur de taille (XIV). La migration par électrophorèse permet de séparer les amplifias et de contrôler leur taille et leur qualité grâce aux UV, qui révèlent la présence du Bet.

b. Amplification du mitogénome complet

Au sein du MNHN, nous avons développé un protocole spécifique pour le séquençage nouvelle génération (Hinsinger et al. 2015), auquel j'ai participé durant ma thèse. Cette approche consiste à utiliser des PCR longues afin de séquencer plus facilement le génome mitochondrial complet et pour un coût proche de celui pour séquencer un seul gène avec les méthodes classiques (Sanger).

L'amplification du mitogénome consiste donc à le couper en 3 parties chevauchantes utilisant ainsi seulement 3 couples d'amorces (Tableau 2) pour obtenir 16 000 pb. Une 1^{ère} amorce appelée **Mt1** va nous permettre d'amplifier du milieu du 12S jusqu'à ARNt-Ser ; l'amorce **Mt2** du ARNt-Cys jusqu'à ARNt-Leu et l'amorce **Mt3** du ARNt-Ser jusqu'au milieu du 16S (Fig. 11).

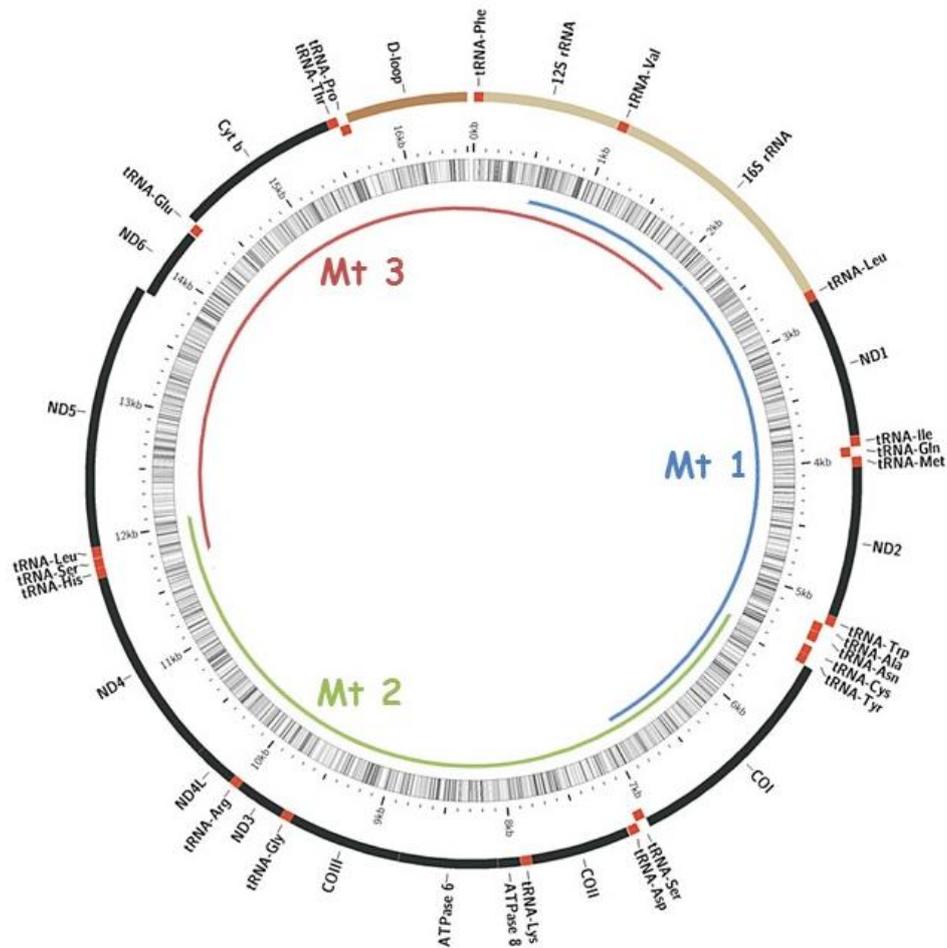


Figure 11 : Schématisation de la position et de la couverture des amorces Mt1, Mt2 et Mt3 utilisées pour obtenir les 3 parties du mitogénome complet (Mennesson, cette thèse)

Les PCR sont réalisées dans un volume total de 18 μ L incluant 5X de TAQ (ADN polymérase recombinante, HotStart LongAmp®), 0,4 ng/ μ L de BSA (Sérum d'Albumine Bovine), 3,5% de DMSO (DiMéthyl SulfOxyde), 300 nM de chaque amorces, 300 μ M de dNTP (DésoxyNucléotide TriPhosphate). Le volume restant est de l'eau.

L'amplification de l'ADN se fait à l'aide d'un thermocycleur (Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler). Le programme de PCR est constitué de plusieurs étapes :

- i. Dénaturation initiale (30 s à 94°C) suivie de 45 cycles comprenant les étapes 2,3 et 4
- ii. Dénaturation (20 s à 94°C)
- iii. Hybridation des amorces (30 s à 62,5°C)
- iv. Elongation (15 min à 65°C)
- v. Elongation terminale (15 min à 65°C)

Une électrophorèse sur gel d'agarose (40 mL de TAE (Tris-acetate-EDTA), 0,3 g d'agarose ; 0,8 µL de Bet (un agent intercalant de l'ADN : Bromure d'Ethydium)) est réalisée afin de visualiser les produits de la PCR. Dans chaque puits du gel est déposé : 3 µL de chaque produit de PCR et 1,2 µL de marqueur de taille (appelé AD²). La migration par électrophorèse permet de séparer les amplifias et de contrôler leur taille et leur qualité grâce aux UV, qui révèlent la présence du Bet.

5. Le séquençage

a. Pour la méthode « Sanger »

Les produits de PCR sont ensuite envoyés au Genoscope (Centre National de Séquençage, Evry) et à Eurofins MWG Operon (Allemagne). Ces derniers y sont séquencés dans les deux sens à l'aide des amorces *forward* et *reverse* que nous leur fournissons.

b. Pour la méthode « NGS »

En plus de l'obtention de longs fragments d'ADN, avec la méthode de Hinsinger et al. (2015), nous pouvons aussi séquencer plusieurs spécimens en même temps. En effet, pour le séquençage, le matériel génétique sera déposé dans une puce qui sera ensuite insérée dans le PGM™ Ion torrent (Personal Genome Machine™) (Glenn, 2011). Et selon la quantité de matériel génétique voulant être séquencée, trois types de puces peuvent être utilisés : une puce 314 (10 MegaBases), Puce 316 (100 MegaBases) et Puce 318 (1 GigaBases). Afin de séquencer plusieurs spécimens dans une même puce, des « banques » ADN seront matérialisées grâce à l'utilisation d'adaptateurs avec des codes-barres. Cependant, avant de lancer le séquençage des étapes intermédiaires doivent être réalisées.

² Le marqueur AD est réalisé en mélangeant des produits PCR issus du séquençage de plusieurs gènes (gènes nucléaires et des mitogénomes en 3 parties) ; ce qui donne un marqueur présentant au moins 2 barres : une pour les morceaux de mitogénome faisant en moyenne 5 000 pb et une seconde aux alentours de 1000-800 pb selon le poids des gènes nucléaires amplifiés.

Préparation de la librairie – Le traitement des échantillons de mitogénomes et de gènes nucléaires débute par une étape de fragmentation mécanique à l'aide d'un Bioruptor® (Fig. 12). Les bouts d'ADN sont ensuite réparés en utilisant le Kit « Ion Xpress Plus Fragment Library Kit » et l'ADN est purifié par une méthode utilisant des billes magnétiques avec le kit « Agencourt® AMPure® XP kit ». En plus de la purification de l'ADN, cette étape permet de sélectionner les gammes de taille des fragments ADN qui seront insérés dans la puce. Ensuite, ces fragments sont liés à un couple d'adaptateur A (permettant de différencier les « banques ») et P (permettant de fixer les fragments aux billes de séquençage) par fusion PCR (Fig. 13).

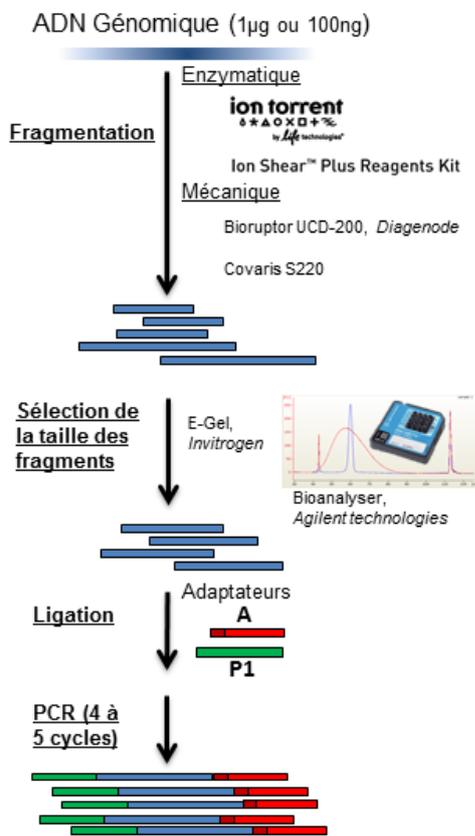


Figure 12 : Etapes de la fragmentation de l'ADN jusqu'à la ligation des adaptateurs. (Modifié d'après biorigami.com)

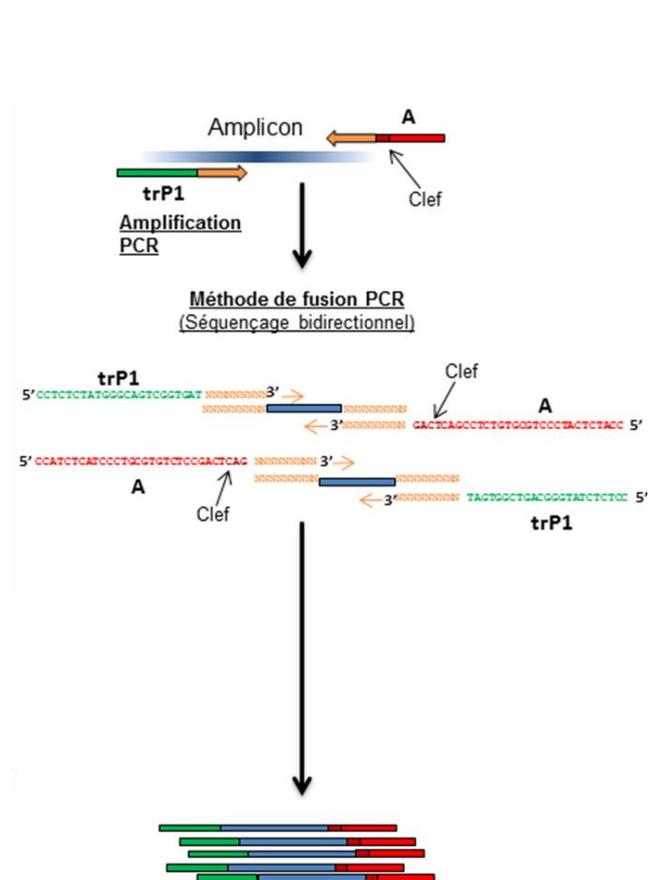


Figure 13 : Etape de la méthode de fusion PCR. (Modifié d'après biorigami.com)

Selon le nombre d'échantillons traités en parallèle (ex : séquençage de 20 spécimens d'*Eleotris*) plusieurs adaptateurs avec code-barres vont être utilisés pour matérialiser les « banques ». Les adaptateurs A seront numérotés de 1 à X (ex : ici X=20 car 20 spécimens d'*Eleotris* voulant être séquençés). Ainsi, chaque « banque » autrement dit, chaque spécimen

d'une même espèce, sera identifié avec un code-barres ce qui permet de pourvoir différencier les fragments ADN de chacun à la sortie du séquenceur.

Une fois les adaptateurs liés au fragment d'ADN, une nouvelle phase de sélection de taille des brins (ici, environ 400 pb) est effectuée similaire à celle de la purification par billes effectuée à la fin de la fragmentation. Une fois cette étape finie, les fragments d'ADN de chaque « banque » sont quantifiés via q-PCR permettant par la suite d'homogénéiser les « banques » les unes par rapport aux autres. Cette étape permet aussi de déterminer la concentration molaire de la librairie et d'y appliquer le facteur de dilution nécessaire pour favoriser le ratio idéal 1/1 (Fragments d'ADN de la librairie/Ion Sphere Particle) pour l'étape suivante de PCR en émulsion.

Préparation de la matrice de séquençage – Cette étape automatisée permet l'amplification clonale (OneTouch2) suivi d'un enrichissement en « Ion Sphere Particles » (ISPs) à la surface desquelles un fragment de librairie est amplifié (OneTouch ES) (Fig. 14). Cette étape est réalisée au cours d'une PCR en émulsion (emPCR), et permettra d'atteindre un seuil de détection du signal nécessaire et suffisant au moment du séquençage. Malgré une optimisation du ratio 1/1 (ISP / Fragment ADN), plusieurs configurations de microréacteurs sont envisageables. Seule la configuration de monoclonalité est souhaitée car elle seule, est source de données de séquençage.

Un enrichissement en ISP (oneTouch ES) est ensuite réalisé. L'amorce ePCR-A couplée à la biotine (incorporée lors de la PCR précédente) est capturée sur des billes liées à la streptavidine (Fig. 15). Ainsi, seule les ISPs à la surface desquelles un fragment de librairie est amplifié sont conservées.

• Amplification clonale

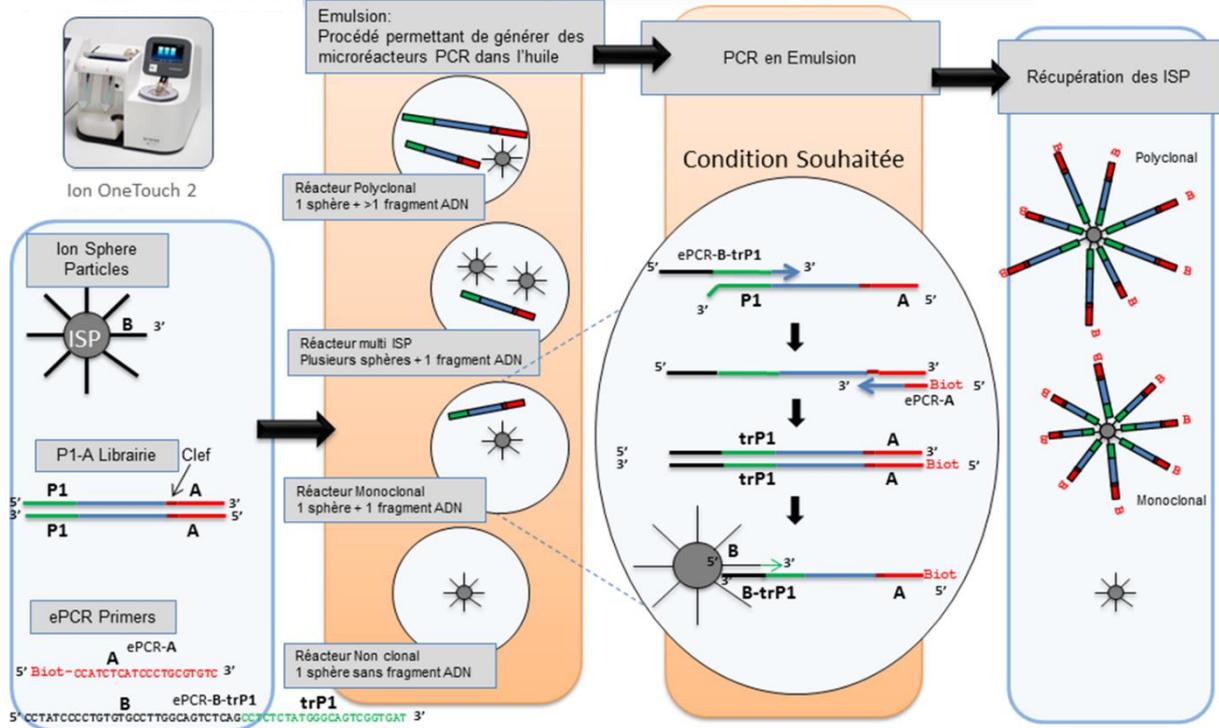


Figure 14 : Etape de l'amplification clonale (OneTouch2) suivi d'un enrichissement en « Ion Sphere Particles » (ISPs)

• Enrichissement ISP

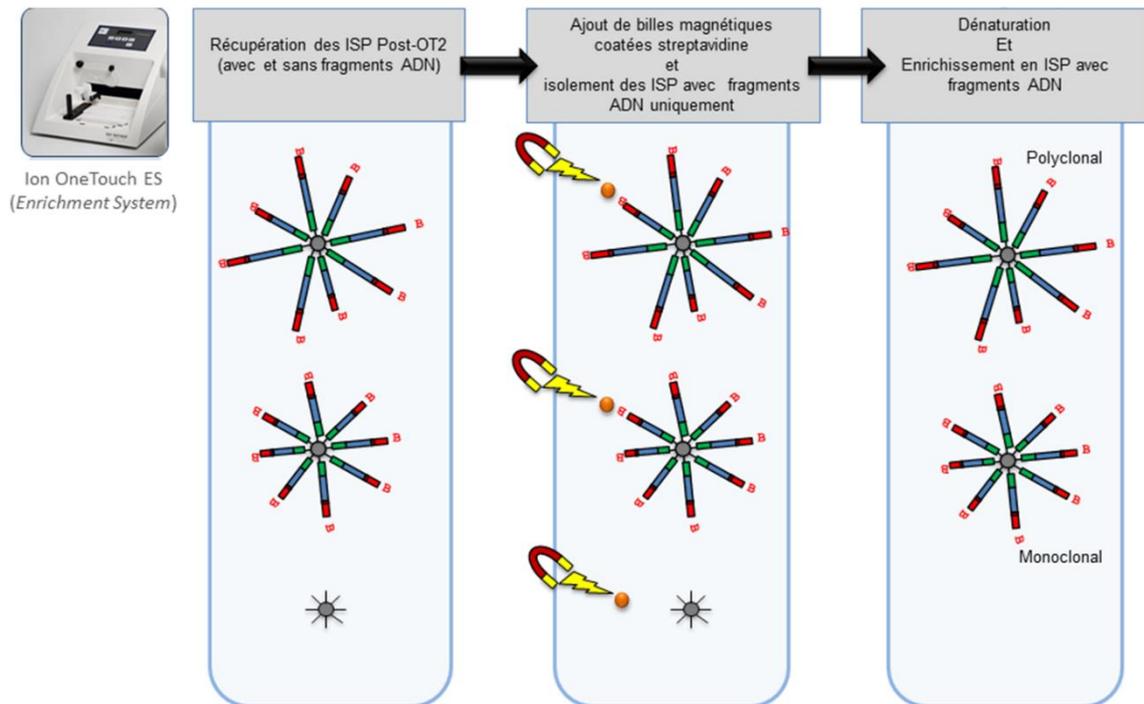


Figure 15 : Etape de l'enrichissement en ISP

Séquençage – Selon un protocole bien spécifique, la matrice de séquençage couplée aux amorces de séquençage et à la polymérase sont chargées sur la puce Ion Torrent (Fig. 16). Le séquençage revient au décryptage simultané des fragments ADN couplés aux ISP. A chaque polymérisation de nucléotides non modifiés, la libération d'ions H⁺ entraîne une variation de pH, elle-même détectée au niveau de la couche mince (technologie des semi-conducteurs) située au fond de chaque puits. L'ensemble des données brutes générées est transcrit sous forme d'ionogrammes.

A l'issue du séquençage, les données brutes (ionogrammes) sont converties sous forme de lettres en séquences (A,T,C,G) formant les *reads*³. Un prétraitement est appliqué sur les *reads* générés : i- trimming : élimination des adaptateurs et/ou des portions de reads de mauvaise qualité, ii- filtres : élimination des reads de petites tailles, de mauvaise qualité et des polyclonaux et iii- regroupement des reads en fonction de leur « code-barres » dans des fichiers séparés. L'ensemble de ces informations est résumé dans un rapport généré par le logiciel *Geneious 9.0.5* (Kearse et al. 2012) à l'issue du prétraitement et nous renseigne sur le nombre de *reads* générés ainsi que leur taille moyenne (Fig. 17).

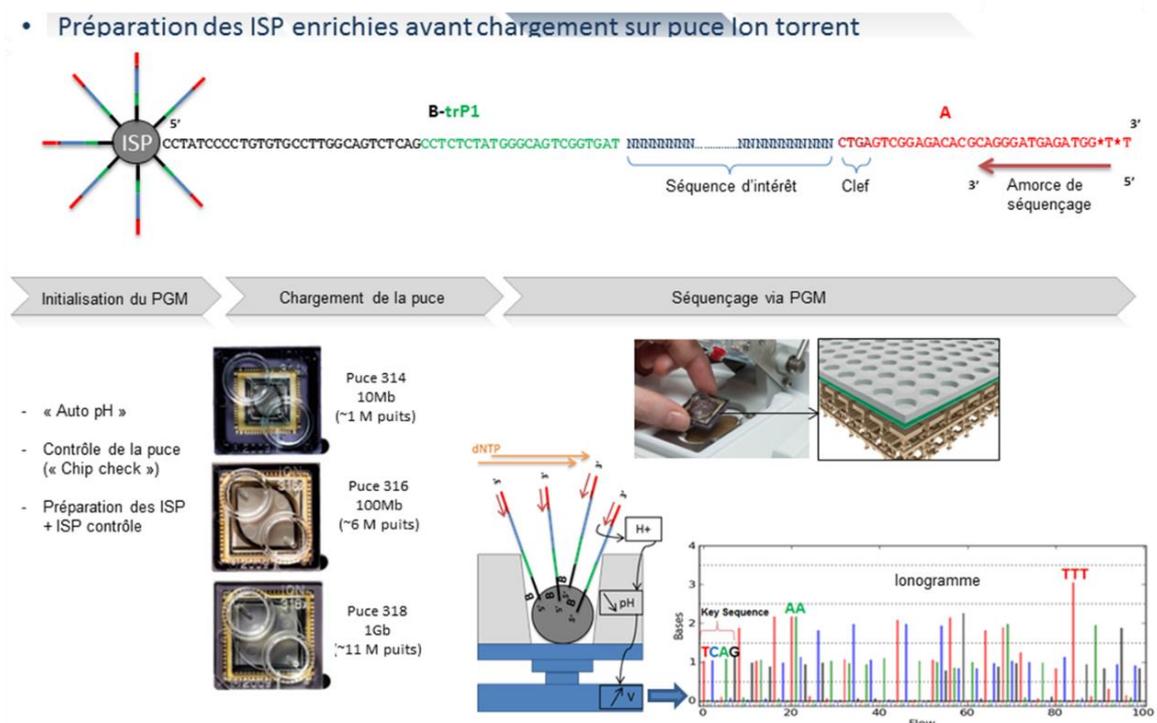


Figure 16 : Etape de la préparation des ISP enrichies avant le chargement sur la puce

³ *Reads* : séquences nucléotidiques issus du séquençage des fragments ADN sélectionnés

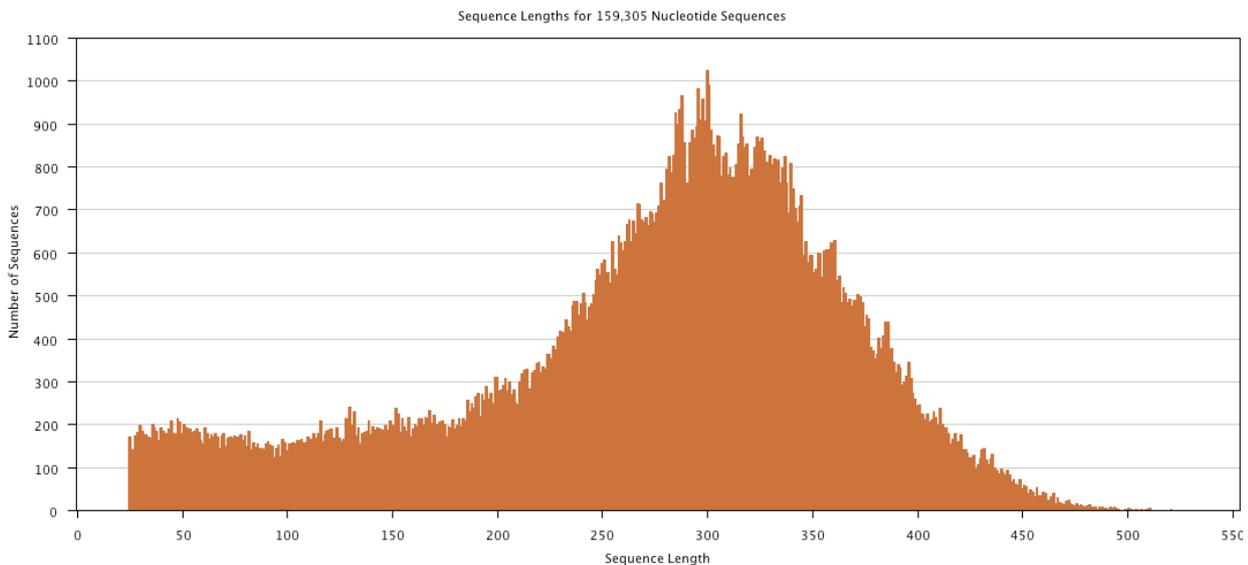


Figure 17 : Exemple de visualisation des données sortant du séquenceur avec le logiciel *Geneious* v.9.0.5. Le nombre de *reads* séquencé est présenté en fonction de leur taille. Un bon séquençage est constitué d'un grand nombre de *reads* dont la taille doit être comprise entre 250 et 450 pb.

6. Vérification, nettoyage et alignement des séquences

a. Pour la méthode « Sanger »

Au retour des centres de séquençage, les séquences sont nettoyées manuellement à l'aide du logiciel *Sequencher* v.4.1.4 (Gene Codes Corporation) puis alignées sous *BioEdit* v.7.0.5.2 (Hall 1999). L'étude des chromatogrammes des séquences *reverse* et *forward* permet de corriger les parties 5' et 3' de la séquence finale.

b. Pour la méthode « NGS »

A la fin du séquençage, nous obtenons autant de fichiers qu'il y a de « banques ». Chaque fichier est donc composé de milliers de *reads* issus des PCR que nous avons réalisé en aval du séquençage. Avec le logiciel *Geneious* 9.0.5, nous allons pouvoir reconstituer les mitogénomes et le gène nucléaire *Rh*, en assemblant tous les *reads* correspondant à un même individu, *i.e.* issus d'une même « banque ». Pour ce faire, dans chaque fichier (ou « banque »), un assemblage « Map to Reference » est réalisé à partir d'une séquence référence ; dans cette étude, au départ, nous avons utilisé comme référence le mitogénome complet d'*E. acanthopoma* réalisée par Miya et al. (2003). Cette méthode permet d'aligner des *reads* à cette séquence de référence et

de fusionner les fragments chevauchant permettant ainsi de former un Contig⁴ (Fig. 18). A partir de cette séquence de référence, un mitogénome complet de *E. fusca* a été obtenu ainsi que celui de d'autres espèces telles que *E. melanosoma*.

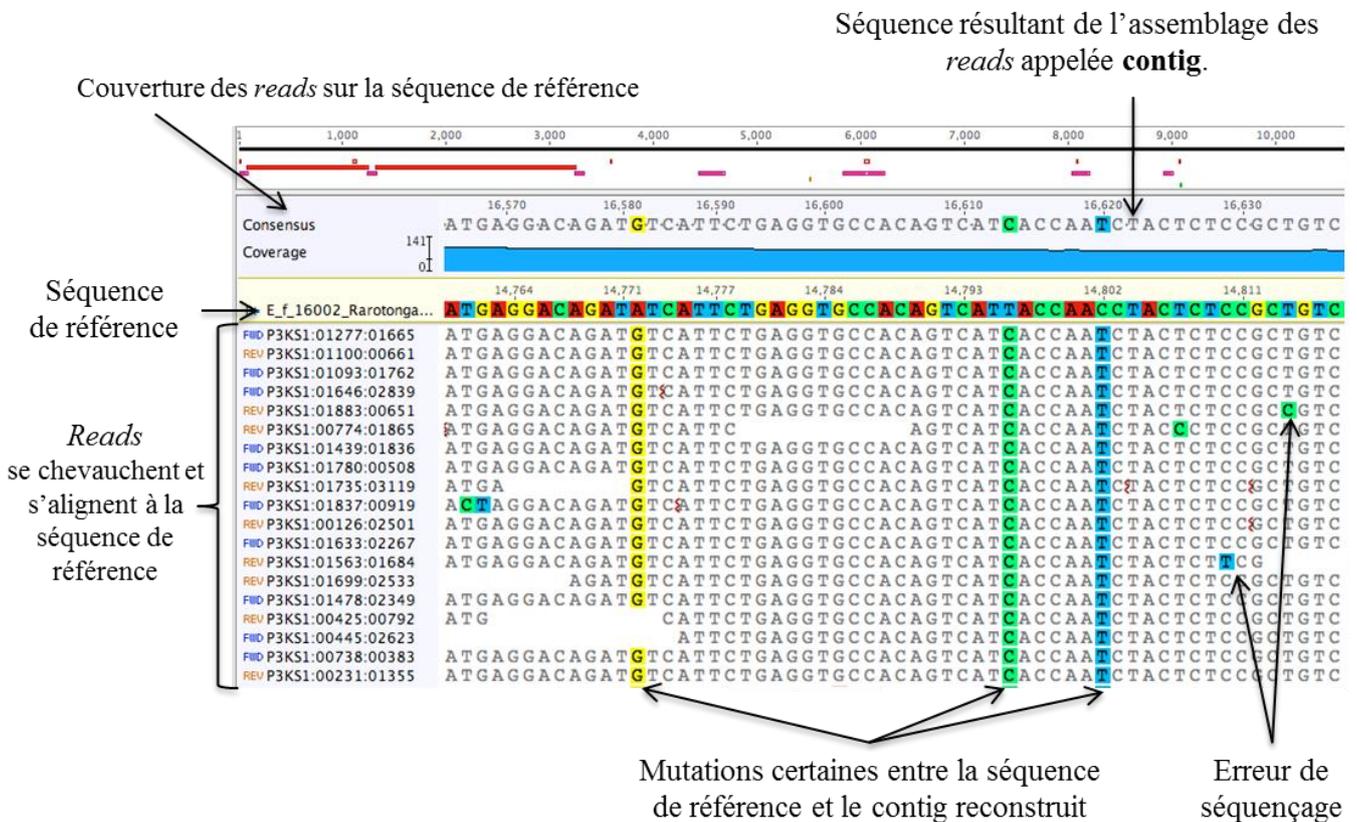


Figure 18 : Exemple d'un alignement de reads à une séquence de référence (ici, un *E. fusca* de Rarotonga)

Pour les marqueurs nucléaires, c'est le même procédé qui est employé sauf que les séquences de référence sont préalablement obtenues par un séquençage « Sanger ».

Néanmoins, des précautions sont à prendre lors de l'assemblage des reads, afin de ne pas créer de chimère. De ce fait, plusieurs points de contrôles sont effectués :

- i- La séquence de référence utilisée doit être celle d'un spécimen du même genre voire de la même espèce quand cela est possible. Ici, nous avons utilisé la seule séquence de

⁴ Contig : séquence génomique continue et ordonnée générée par l'assemblage des clones (reads) d'une bibliothèque génomique.

référence appartenant au genre *Eleotris* : « *E. acanthopoma* » issu de MitoFish (Mitochondrial Genome Database of Fish) (Iwasaki et al. 2013).

ii- Au fur et à mesure que l'on avance dans le nettoyage, certains *reads* peuvent poser problème et avant de les supprimer, un « BLAST⁵ » doit être effectué pour s'assurer de l'appartenance de la séquence : soit elle appartient à un *Eleotris* soit à une autre espèce. Cette étape permet de vérifier si les mutations intra-spécifiques (Fig. 18) correspondent bien à un spécimen d'*Eleotris*. Et si ce n'est pas le cas, le ou les *reads* sont supprimés.

iii- Une fois l'assemblage des *reads* complet et « propre » par rapport à la séquence de référence, il faut vérifier l'annotation du mitogénome (ex : la longueur et le sens de lecture des gènes) obtenu avec la fonction *MitoAnnotator* présente sur le site de MitoFish.

Une fois que tous les mitogénomes sont complets et annotés, ces derniers sont alignés avec *Muscle Alignment* (implémenté dans *Geneious*).

7. Résumé du jeu de données moléculaire obtenu

Avec la méthode « Sanger » – Au total, 710 séquences ADN d'*Eleotris* ont pu être obtenues avec cette méthode, nous permettant de caractériser chaque individu et donc d'identifier le nombre d'espèces potentielle en notre possession (Tableau 4).

Avec la méthode « NGS » – Ce sont au total, 35 mitogénomes complets (*i.e.*, mtDNA) qui ont été obtenus et 7 partiels.

i- Mitogénomes complets : 23 *E. fusca* ; 6 *E. cf. fusca* ; 1 *E. acanthopoma* ; 2 *E. bosetoi* ; 2 *E. melanosoma* et 1 *E. cf. sp1 melanosoma*.

ii- Mitogénomes partiels : 1 *E. fusca* ; 2 *E. cf. fusca* ; 1 *E. acanthopoma*, 1 *E. cf. acanthopoma* ; 1 *E. cf. sp3 melanosoma* ; 1 *E. cf. sp1 melanosoma*.

⁵ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) : comparaison d'une séquence requête nucléique à une banque de séquences nucléiques (ici, Genbank) en trouvant les régions de similarité locale entre les séquences.

Tableau 4 : Résumé du jeu de données obtenu à l'issu du séquençage « Sanger ». N_E : nombre de spécimens entiers, N_B : nombre de morceaux de tissus (nageoire) et N_{PL} : nombre de post-larves.

Régions	Pays	Iles	<i>E. fusca</i>			<i>E. acanthopoma</i>			<i>E. cf. pellegrini</i>			<i>E. bosetoi</i>			<i>E. melanosoma</i>			<i>E. cf. melanosoma</i>		
			N _E	N _B	N _{PL}	N _E	N _B	N _{PL}	N _E	N _B	-	N _E	N _B	N _{PL}	N _E	-	N _{PL}	N _E	-	-
Centre de l'Océan Pacifique	Iles de la Société	Moorea	30	2	10	9	-	50	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	Iles Australes	Rurutu	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	-	Tubuai	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Iles Marquises	Ua huka	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Iles Cook	Rarotonga	13	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sud-Ouest de l'Océan Pacifique	Vanuatu	Maewo	10	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	Santo	16	2	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	Malakula	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	Epi	1	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	Gaua	6	-	2	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nouvelle-Calédonie	Grande Terre	3	56	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Iles Hoorn	Futuna	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fidji	Taveuni	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Samoa	Upolu	13	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Salomon	Choiseul	7	10	4	-	-	-	-	-	-	2	4	1	-	-	-	-	-	-
-	Kolombangara	50	-	47	-	-	8	-	-	-	2	-	2	2	3	-	-	-	-	
Nord-Ouest de l'Océan Pacifique	Indonésie	Bali	17	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	1	-
	-	Papua	1	9	23	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Philippines	Panay	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Iles Caroline	Palau	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Micronésie	Pohnpei	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Iles Ryū-Kyū	Okinawa	14	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Nord-Ouest de l'Océan Indien	Seychelles	Silhouette	-	2	-	5	4	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Comoros	Anjouan	-	2	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	Moheli	-	11	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mayotte	Mayotte	2	34	-	3	6	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	
Sud-Ouest de l'Océan Indien	Mascareignes	Réunion	7	8	10	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	Maurice	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Madagascar	Madagascar	-	5	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sous-total			253	171	140	37	11	62	3	4	4	4	3	13	4	1	-	-	-	-
Total			564			110			7			11			17			1		

8. Reconstruction phylogénétique par inférence bayésienne

Dans le cadre de cette thèse, la **reconstruction phylogénétique** entre les individus repose sur des **données moléculaires** *i.e.*, des séquences nucléotidiques. Parmi les différentes méthodes de reconstructions phylogénétiques, nous avons choisi l'une des méthodes probabilistes fondées sur le concept de vraisemblance : **l'approche bayésienne**. Cette dernière permet d'estimer de façon simultanée la phylogénie et le mode d'évolution des séquences car elle prend en considération : i- toutes les possibilités de mutations nucléotidiques entre les séquences (comme les transitions A ↔ G ou C ↔ T et les transversions A ↔ C, G ↔ T, C ↔ G ou A ↔ T) y compris les réversions (ex : A → G → A), ii- les fréquences nucléotidiques, iii- la présence d'une fraction de sites invariables et iv- l'hétérogénéité des taux de substitution entre sites. En effet, afin d'avoir une méthode probabiliste statistiquement robuste et performante,

des modèles décrivant de façon la plus réaliste possible les processus biologiques d'évolution des séquences doivent être incorporés (Fig. 19).

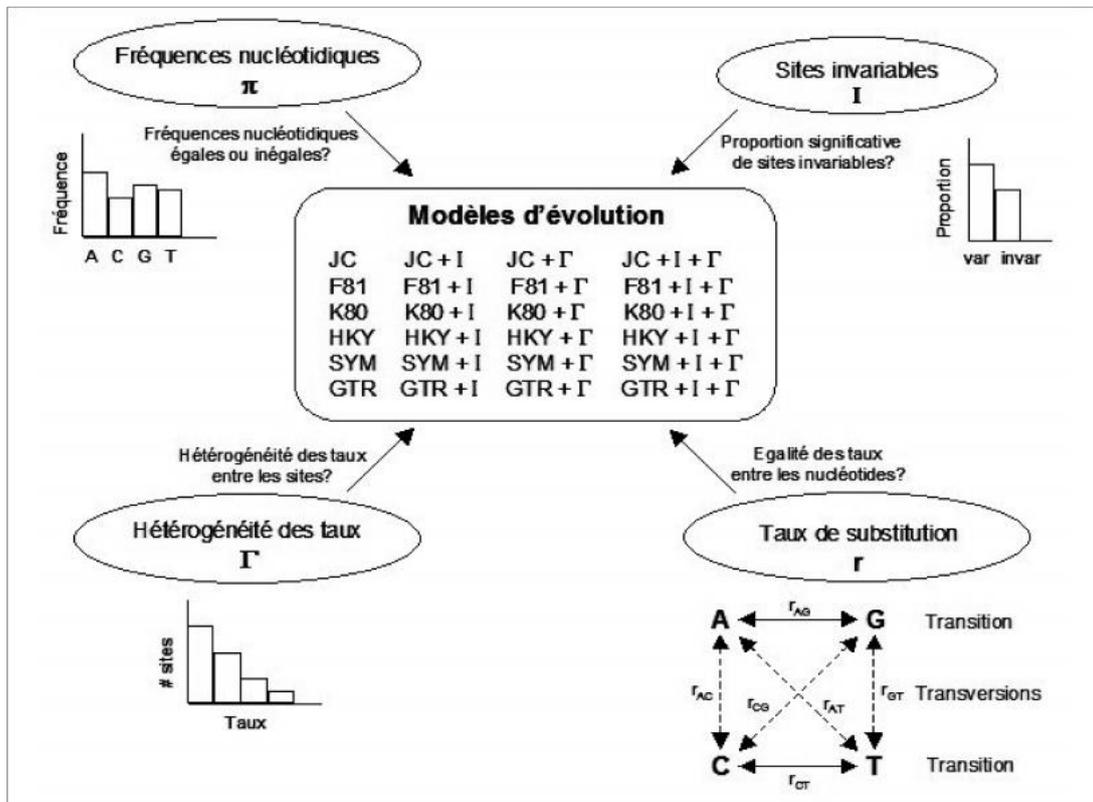


Figure 19 : Constitution des principaux modèles d'évolution des séquences nucléotidiques. Adapté d'après Posada & Crandall (2001), titré de Delsuc & Douzery (2004).

Ces modèles de substitution permettent de calculer les probabilités des différents changements observés entre les séquences sous différentes hypothèses concernant leur processus d'évolution. L'une des principales hypothèses incorporées dans ces modèles est que les processus de substitution, *i.e.* le remplacement d'un nucléotide par un autre à un site donné, correspondent à un processus de Markov où la probabilité de passer de l'état i à l'état j dépend uniquement de l'état i et non pas des événements précédant cet état. De plus, ce processus de Markov est généralement supposé être homogène, autrement dit, que les probabilités de substitutions ne changent pas le long des branches de l'arbre. De nombreux modèles évolutifs existent (Fig. 19), allant du plus simple avec celui de Jukes & Cantor (1969) qui induit une fréquence pour chaque nucléotide et un taux substitution identiques pour les 6 types de substitutions, au plus général mais néanmoins complexe avec le GTR (General Time Reversible) (Yang 1994) qui autorise des taux différents pour les 6 types de substitution.

Afin d'obtenir les meilleurs résultats, il est important d'employer des modèles qui s'ajustent le mieux possible aux données analysées. Etant donné le nombre de modèles et la complexité de certains, il est indispensable de disposer d'un critère objectif de choix entre les différents modèles existants (Posada & Crandall 2001). Comme par exemple, le critère d'information d'Akaike (ou AIC pour 'Akaike Information Criterion') qui a été proposé par Akaike (1974) pour comparer les différents modèles.

Ayant choisi l'approche bayésienne pour nos analyses, le calcul des modèles a été effectué avec *PartitionFinder* (Lanfear et al. 2012). Ce programme prend en compte 56 modèles globaux de substitutions différents (en incluant les paramètres Γ et I) et pour chaque analyse, le critère d'information bayésien (ou BIC pour 'Bayesian Information Criterion', Schwarz 1978) a été utilisé afin de trouver les meilleurs modèles pour notre jeu de données.

D'un point de vue général, la vraisemblance (L) est la probabilité conditionnelle (Pr) d'observer les données X sous un modèle particulier (ici, sous l'hypothèse H) : $L_X = \text{Pr}(X/H)$. **Appliqué à la phylogénie**, le concept de vraisemblance postule que la vraisemblance L_X est la probabilité conditionnelle d'observer les données X (*i.e.*, un alignement de séquences) étant donné un arbre T, ayant une topologie et des longueurs de branches données : $L_X = \text{Pr}(X/T)$. **L'inférence bayésienne** est fondée sur le calcul de probabilités postérieures (*a posteriori*) des arbres phylogénétiques par la combinaison d'une probabilité *a priori* avec la fonction de vraisemblance. En effet, cette approche combine la probabilité *a priori* $\text{Pr}(T)$ d'un arbre T avec la vraisemblance $\text{Pr}(X/T)$ des données X sachant cet arbre T pour produire une distribution de probabilité postérieure $\text{Pr}(T/X)$ sur les arbres en utilisant la formule de Bayes (Delsuc & Douzery 2004) :

$$\text{Pr}(T/X) = \frac{\text{Pr}(X/T) \cdot \text{Pr}(T)}{\text{Pr}(X)}$$

La probabilité postérieure d'un arbre peut être interprété comme la probabilité que cet arbre soit vrai sachant les données. Les inférences sont réalisées à partir de la distribution de probabilité postérieure des différents arbres évalués au cours de l'analyse. L'inférence bayésienne produit donc une collection d'arbres dont l'information phylogénétique peut être résumée en calculant le consensus majoritaire. La fréquence avec laquelle les différents nœuds apparaissent dans les arbres visités représente leur probabilité postérieure associée. Les probabilités postérieures présentent l'avantage d'être facilement interprétables statistiquement.

En effet, elles représentent la probabilité qu'un clade donné soit vrai étant donné le modèle d'évolution, les probabilités *a priori*, et les données considérées (Delsuc & Douzery 2004, Huelsenbeck et al. 2001).

Néanmoins, le calcul des probabilités postérieures des arbres étant impossible à résoudre, l'estimation de ces dernières se fait donc par l'approche algorithmique MCMC ('Markov Chain Monte Carlo'). Il faut voir une chaîne de Markov comme une forme de marche guidée où chaque pas explore l'espace multidimensionnel des paramètres. En échantillonnant les valeurs de ces derniers de manière périodique, elle permet d'estimer une distribution de probabilité. L'approximation de la distribution sera d'autant plus exacte que le nombre de pas effectués par la chaîne de Markov sera élevé (Lewis 2001). En résumé, chaque pas va impliquer une modification aléatoire de la topologie et des longueurs de branches de l'arbre ainsi que des paramètres du modèle d'évolution des séquences.

L'une des limites potentielles de l'utilisation des MCMC est le problème de la convergence de ces chaînes. En effet, il faut qu'un nombre suffisamment élevé de générations (ou de pas) de MCMC soit réalisé pour obtenir une estimation la plus exacte possible de la distribution des probabilités postérieures. Et l'utilisation de l'algorithme MC³ (ou MCMCMC pour 'Metropolis Coupling Markov Chain Monte Carlo') contribue à la réduction des risques de défaut de convergence des MCMC (Huelsenbeck & Ronquist 2001).

L'approche bayésienne permet donc de faire des inférences, *i.e.* d'estimer les propriétés d'un taxon à partir d'un échantillon décrit statistiquement. Celle-ci est réalisée à l'aide du logiciel *MrBayes* v.3.2 (Ronquist et al. 2012), à travers quatre chaînes de Markov de 10 millions de générations (ou pas) dont on supprime les 25 premiers pourcents (burnin de 25%), et qui sont sous-échantillonnées toutes les 200 générations. On obtient ainsi 37 500 arbres pour réaliser la topologie finale qui est représentée par le consensus majoritaire à 50%. Pour s'assurer de la convergence des analyses, le logiciel *TRACER* v.1.6.0 (Rambaut & Drummond, 2007) a été utilisé. La robustesse des branches de chaque clade est donnée par les valeurs de probabilités postérieures exprimées en pourcentage. Et pour finir, l'arbre final est visualisé grâce *FigTree* v.1.4.2 (Rambaut 2007).

9. Etude de la phylogéographie des espèces

a. Avant-propos : les principes d'une étude phylogéographique

L'un des défis majeurs pour les biologistes est d'établir les liens entre l'écologie et l'évolution des espèces. Un tel lien est alimenté par la relation entre la capacité de dispersion et l'échelle spatiale avec laquelle les populations diffèrent génétiquement. La compréhension de l'évolution requiert de connaître comment le mouvement des gènes au travers des populations (*i.e.*, le flux de gènes) interagit avec dérive génétique et la sélection naturelle. Les études sur la différenciation génétique des populations sont particulièrement utiles, étant donné qu'elles permettent d'inférer sur comment les forces d'évolution ont interagi tout au long de l'histoire de vie de l'espèce.

La **phylogéographie** fait le lien entre la **génétique des populations** *i.e.*, la distribution et l'évolution au cours du temps des fréquences alléliques et génotypiques dans les populations, et la **phylogénie** *i.e.*, l'histoire de la descendance des individus (Avice 2009, Riddle 2009). Elle permet d'étudier la distribution géographique des différentes lignées génétiques d'une espèce, ou d'espèces proches, et les relations généalogiques à l'aide de réseaux d'haplotypes. Ceci permettant de mettre en évidence des patrons d'isolement communs à plusieurs lignées qui sont souvent liés à des événements de l'histoire géologique et/ou climatique (Avice 2000, Riddle 2009).

Seule la phylogéographie de l'espèce *E. fusca* sera présentée dans cette thèse (*cf.* chapitre 5). La méthodologie employée est décrite ci-dessous.

b. Analyse de la structure spatiale des populations

Les indices de diversité

Pour chaque localité, les indices de diversité suivants ont été estimés grâce aux logiciels *Arlequin* v3.11 (Excoffier et al. 2005) et *DNA_{sp}* v5.1 (Librado & Rozas 2009) :

- N : nombre de séquences utilisées
- π : diversité nucléotidique *i.e.* nombre moyen de différences nucléotidiques entre paire de séquences prises au hasard dans la même population (Tajima 1983)

- h : nombre d'haplotypes i.e. séquences polymorphes uniques qui peuvent être partagées ou non par plusieurs individus
- H_d : diversité haplotypique i.e. probabilité que deux séquences tirées au hasard et sans remise dans l'échantillon soient différentes

Les réseaux d'haplotypes

Ce type de réseau reflète mieux la structure du réseau généalogique au sein d'une espèce que les arbres phylogénétiques (Excoffier & Smouse 1994, Bandelt et al. 1999) et tient mieux compte des relations entre les haplotypes récents et ancestraux qui peuvent coexister au sein d'une population d'une même espèce. De plus, les réseaux d'haplotypes permettent de bien visualiser les relations généalogiques entre les différents haplotypes et leur distribution géographique.

La recherche des haplotypes partagés par plusieurs individus a été effectuée avec le logiciel *DNAsp* v5.1 (Librado & Rozas 2009). Le réseau d'haplotypes est ensuite conçu dans le logiciel *Network* v4.6.1.1 par la méthode du Median-Joining (Bandelt et al. 1999) afin de déterminer comment sont répartis les haplotypes dans le jeu de données et donc en fonction des localités et des océans. Etant donné la complexité du réseau (nombre de séquences important et nombreux haplotypes correspondant à un seul individu), le critère « Frequency > 1 » a été utilisé *i.e.*, que toutes les séquences uniques ne sont pas prises en compte lors de la réalisation du réseau. De plus, l'option Maximum de Parcimonie a été employée dans le but de simplifier la répartition complexe des branchements ; permettant d'obtenir le réseau le plus parcimonieux.

c. Analyses multivariées de la structuration génétique des populations

La structuration génétique entre les îles est estimée par le calcul des ***F* statistiques** implémenté dans *Arlequin* v3.11 (avec 10 000 permutations). Les *F* statistiques permettent de décrire la **variabilité génétique** entre et au sein des populations (Wright 1951).

Le paramètre de différenciation génétique dans les populations est noté F_{ST} (Wright 1965) et est estimé à partir d'une AMOVA (Analysis of MOlecular VAriances, Excoffier et al. 2005), qui peut être considérée comme l'équivalent d'une analyse de variance hiérarchisée

(ANOVA) non paramétrique. Pour réaliser une AMOVA certaines conditions sont à respecter. En effet, le jeu de données doit présenter au moins deux localités ou populations distinctes, plus de trois individus par population et que les populations soient équilibrées (environ le même nombre d'individus).

Les F_{ST} intègrent à la fois les fréquences haplotypiques et le nombre de substitutions nucléotidiques entre les différents haplotypes. La valeur minimale théorique des F_{ST} , soit $F_{ST} = 0$, correspond à une absence de divergence génétique entre les deux populations et donc, plus les F_{ST} sont proches de 1 (valeur maximale), plus la divergence génétique est importante. Plus précisément, l'indice de fixation F_{ST} correspond à la probabilité que deux allèles choisis au hasard à l'intérieur d'une même sous population soient identiques par ascendance. A mesure que la dérive génétique se poursuit de génération en génération, le F_{ST} change de valeur.

d. Test de neutralité sélective et d'équilibre des populations

Le test de Fu (Fu 1997) permet de voir s'il existe un excès de mutations récentes dans les séquences, ce qui correspondrait à un processus sélectif non neutre tel que la sélection positive ou la croissance d'une population. Si les valeurs de F_s de Fu sont significativement négatives (*i.e.*, excès de mutations récentes), cela indique une population en expansion.

Chapitre 2

Bilan taxonomique du genre *Eleotris*

I. Rappel, taxonomie et Code de nomenclature

Depuis 1758, avec le *Systema naturae* de Linné, les organismes sont classés dans une série de catégories renfermant des groupes *i.e.*, des taxons. Ainsi, un taxon est désigné comme un groupe d'organismes reconnu en tant qu'unité formelle. En effet, Linné a introduit la **nomenclature binominale** de l'espèce qui oblige à donner, pour chaque espèce, un nom spécifique qui serait précédé d'un nom de genre.

Ainsi, la nomenclature consiste à attribuer des noms scientifiques aux différentes espèces et aux autres taxons que l'on distingue. Celle-ci est régie de nos jours par un ensemble de règles rassemblées dans un **Code international de nomenclature zoologique**. Le but fondamental de ce dernier est « de donner, en ce qui concerne l'universalité et la continuité dans les noms scientifiques des animaux, le maximum compatible avec la liberté qu'ont les chercheurs de classer les animaux en fonction de leur jugement taxonomique ».

L'une de règles fondamentales de la nomenclature est la loi de priorité, qui veut qu'une espèce décrite plusieurs fois sous des noms différents porte en définitif celui que lui a donné son premier descripteur, la date de publication faisant foi. Les noms donnés à la même espèce dans des descriptions ultérieures sont des *synonymes* (Matile et al. 1987). En cas de doute ou de litige sur l'identification d'un échantillon, on doit se reporter sur l'échantillon international de référence : le *type*. Le type d'une espèce est objectif et immuable, alors que les limites de celle-ci en tant que taxon sont subjectives et susceptibles d'être changées.

Le Code impose que, lorsque l'on décrit une espèce, seul un des exemplaires que l'on a sous les yeux doit être choisi comme type, car ce dernier doit être représenté que par un seul spécimen. Cet unique spécimen est appelé l'*holotype* et il correspond généralement (mais pas obligatoirement) à l'échantillon photographié ou dessiné. Si les autres exemplaires issus du même lot que l'holotype font partis de la description originale de l'espèce, ils porteront le nom de *paratypes*.

Concernant les descriptions récentes, le Code ne reconnaît pas d'autres catégories que l'holotype et les éventuels paratypes. Mais, il reconnaît, lorsque la nécessité s'en fait sentir, le *néotype*. Ce dernier est un spécimen que l'on désigne lorsque l'on a la certitude que l'holotype d'une espèce est perdu ou détruit. Sa désignation est faite seulement lorsqu'il s'agit de résoudre un problème important de nomenclature ou de biologie. Le *néotype* doit répondre à certaines

exigences, dont la plus importante est qu'il provienne d'une localité la plus proche possible de celle de l'holotype perdu.

Avant la parution du Code, les scientifiques n'avaient pas l'habitude de désigner des types uniques *i.e.*, des holotypes. De ce fait, sont désignés sous le nom de **syntypes**, tous les spécimens que ces scientifiques avaient sous leurs yeux au moment de la description d'une espèce, ou de tous ceux qui restent reconnaissables dans les collections. De plus, le Code a mis en place, pour les scientifiques qui révisent une espèce anciennement décrite, le terme de **lectotype**. En effet, lorsque l'holotype n'est plus mais que des syntypes sont présents, le scientifique se doit de décrire un spécimen de référence parmi ces syntypes : le lectotype, qui sera l'équivalent de l'holotype. Les autres syntypes deviendront des **paralectotypes** *i.e.*, des paratypes.

Tous les types doivent être déposés dans une institution scientifique, un musée ou une université, ayant les moyens humains et matériels de les conserver intacts et de les communiquer aux scientifiques qui ont besoin de s'y référer.

Pour chaque espèce présumée, une « **diagnose** » est établie comportant une série de caractères dits « spécifiques », qui permet à son tour de définir tel ou tel spécimen que l'on a sous les yeux comme membre d'une espèce, et non d'une autre. Ainsi, sont appelés **caractères systématiques**, les caractères permettant de dire qu'un taxon A diffère d'un taxon B, ou encore indiquant que deux taxons concordent entre eux mais diffèrent d'un troisième.

« L'importance qu'ont pour la classification, les caractères insignifiants, dépend principalement de leur corrélation avec beaucoup d'autres caractères qui ont une importance plus ou moins grande. Il est évident, en effet, que l'ensemble de plusieurs caractères doit souvent, en histoire naturelle, avoir une grande valeur ». **Charles Darwin**, *L'origine des espèces*, 1859.

Hennig¹, à la suite de Darwin, souligne qu'il ne faut négliger aucun des caractères portés par un organisme car des caractères, pouvant avoir selon certain peu d'importance, peuvent se

¹**Hennig E.H.W.** (1913-1976) était un biologiste allemand, célèbre pour avoir posé les fondements de la classification phylogénétique en développant le paradigme cladiste. Avec ses travaux sur l'évolution et la systématique, il a révolutionné l'étude des relations de parenté entre les êtres vivants.

révéler de précieux indices de relations de parentés. Parmi tous les caractères que l'on peut examiner, tous ne peuvent être reconnus comme caractères systématiques. On doit chercher leur signification, leur nature, lorsqu'on les compare d'une espèce à l'autre. Il est donc important de déterminer si les caractères sont homologues² ou homoplasiques³.

« Nous avons vu que les membres de la même classe, indépendamment de leurs habitudes d'existence, se ressemblent sur le plan général de leur organisation. Cette ressemblance est souvent exprimée par le terme *d'unité de type*, c'est-à-dire que chez les différentes espèces de la même classe les diverses parties et les divers organes sont homologues. L'ensemble de ces questions prend le nom général de *morphologie* et constitue une des parties les plus intéressantes de l'histoire naturelle, dont elle peut être considérée comme l'âme ». **Charles Darwin**, *L'origine des espèces*, 1859.

Comme nous l'avons exposé lors du chapitre précédent, il est difficile de définir un protocole strict de l'identification des espèces composant le genre *Eleotris* lorsqu'elles sont échantillonnées sur le terrain tant elles sont difficiles à différencier. De plus, dans la littérature, plus de 34 noms d'espèces d'*Eleotris* sont répertoriés et certains scientifiques n'en valident que 14. Cependant, en observant de plus près un grand nombre de spécimens, qui étaient censés appartenir à la même espèce, certains critères morpho-méristiques nous ont interpellés. Et de ces observations des questions sont apparues. Avec le peu d'information contenu dans certaines descriptions d'espèce, il y avait de forte chance pour que la taxonomie du genre *Eleotris* dans l'Indo-Pacifique soit à revoir. De ce fait, toute recherche visant à étudier les espèces d'*Eleotris* de cette région devait nécessiter, dans un premier temps, de résoudre la taxonomie du genre afin de pouvoir relier avec certitude les traits d'histoire de vie que nous observons aux « bonnes » espèces.

² L'**homologie** désigne un caractère propre à plusieurs espèces hérité d'un ancêtre commun. Les structures en question, qu'elles soient d'ordre anatomique, moléculaire ou génétique, partagent donc une histoire évolutive.

³ L'**homoplasie** est le fait qu'un caractère similaire soit rencontré chez deux espèces alors que leur ancêtre commun ne le possède pas.

Dans ce chapitre, nous traiterons de la **taxonomie « classique »** *i.e.*, de la description de la diversité des *Eleotris* de l'Indo-Pacifique et de l'élaboration d'une révision des espèces en fonction de critères morpho-méristiques. La première partie du travail a donc consisté à faire :

- i. Une première liste des espèces supposées valides de l'Indo-Pacifique présentes dans la littérature.
- ii. Une seconde liste avec tous leurs synonymes.
- iii. Une recherche de tous les types existants qui sont répertoriés sous les noms d'*Eleotris* cités dans la littérature.
- iv. Une étude morpho-méristique et une comparaison de tous les types qui sont présents dans les collections muséales que nous avons pu consulter auxquels nous avons ajoutés les spécimens collectés sur le terrain.
- v. La liste réelle des espèces valides avec une clé de détermination.

II. Rappel sur l'état actuel des espèces valides d'*Eleotris* de l'Indo-Pacifique et recherche des types dans les collections muséales

Nous avons vu dans le chapitre introductif que selon Eschmeyer & Fricke et Kottelat (Eschmeyer & Fricke 2016, Kottelat 2013), il existerait **14 espèces valides** d'*Eleotris* réparties dans l'Indo-Pacifique (Tableau 1) avec pour chacune un grand nombre de synonymes. Soit plus de 34 noms d'espèces d'*Eleotris* répertoriés dont une dizaine ne possède pas de type auquel se référer (ex : *Eleotris incerta* Blyth, 1860 et *E. hainanensis* Chen, 1933). A partir de la base de données du « Catalog of Fishes » de Eschmeyer (California Academy of Sciences, CAS), nous pouvons savoir si un type existe ou non pour chaque espèce d'*Eleotris* et où il est localisé.

Tableau 1 : Liste des espèces d'*Eleotris* valides de l'Indo-Pacifique selon Eschmeyer (CAS) et Kottelat (2013). Les espèces sont classées par date de description.

Nom valide	Auteur(s)	Localité type	Statuts Eschmeyer-Kottelat
<i>Eleotris fusca</i>	Bloch & Schneider, 1801	Raiatea, French	espèce
<i>Eleotris mauritiana</i>	Bennett, 1832	West Indian Ocean	espèce
<i>Eleotris oxycephala</i>	Temminck & Schlegel, 1845	Japon	espèce
<i>Eleotris acanthopoma</i>	Bleeker, 1853	Sumatra	espèce
<i>Eleotris melanosoma</i>	Bleeker, 1853	Western Sumatra, Wahai	espèce
<i>Eleotris sandwicensis</i>	Vaillant & Sauvage 1875	Hawaiian Islands	espèce
<i>Eleotris lutea</i>	Day, 1876	Andaman Island	espèce
<i>Eleotris tubularis</i>	Heller & Snodgrass, 1903	Coco island	espèce
<i>Eleotris balia</i>	Jordan & Seale, 1905	Japon & Chine	espèce & syno. <i>E. oxycephala</i>
<i>Eleotris andamensis</i>	Herre, 1939	Andaman Island	espèce
<i>Eleotris fasciatus</i>	Chen, 1964	Taiwan	espèce
<i>Eleotris pellegrini</i>	Maugé, 1984	Madagascar	espèce
<i>Eleotris vomerodontata</i>	Maugé, 1984	Madagascar	espèce
<i>Eleotris aquadulcis</i>	Allen & Coates, 1990	Papua	espèce

Tableau 2 : Liste des types disponibles dans les collections muséales que nous avons pu observer. N : nombre de spécimens observés ; Pub : planches de dessins observées dans des publications ; « ? » problème d'étiquetage de l'holotype ; « ?? » spécimen non étiqueté dans un bocal rempli d'une trentaine de spécimens.

Nom des types	Auteur(s)	Localité type	Statuts Eschmeyer-Kottelat	Type(s)	N
<i>Eleotris niger</i>	Quoy & Gaimard, 1824	Indonesia, Waigeo	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Syntype	1
<i>Eleotris mauritiana</i>	Bennett, 1832	West Indian Ocean	espèce	Holotype ?	?
<i>Eleotris oxycephala</i>	Temminck & Schlegel, 1845	Japon	espèce	Possible syntype	1
<i>Eleotris brachyurus</i>	Bleeker, 1849	Southern Java, Patjitan	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Syntypes	??
<i>E. melanurus /melanura</i>	Bleeker, 1849	Southern Java, Pasuruan	synonyme d' <i>E. fusca</i>	type ?	1
<i>Eleotris melanosoma</i>	Bleeker, 1853	Western Sumatra, Wahai	espèce	Syntypes	2
<i>Eleotris acanthopoma</i>	Bleeker, 1853	Sumatra	espèce	Holotype	1
<i>Eleotris pseudacanthopomus</i>	Bleeker, 1853	Western Sumatra	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Holotype	1
<i>Culius macrocephalus</i>	Bleeker, 1857	Indonesia - Buru	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>	Holotype	1
<i>Eleotris fornasini</i>	Bianconi, 1857	Mozambique	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Holotype	1
<i>Eleotris soaresi</i>	Playfair, 1867	Mozambique	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Syntypes	2
<i>Culius insulindicus</i>	Bleeker, 1875	Indonesia - Sumatra	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>	Syntypes	3
<i>Culius macrolepis</i>	Bleeker, 1875	Indonesia - Ambon	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>	Syntypes	2
<i>Eleotris sandwicensis</i>	Vaillant & Sauvage 1875	Hawaiian Islands	espèce	Syntypes	5
<i>Eleotris lutea</i>	Day, 1876	Andaman Island	espèce	Syntypes	pub
<i>Eleotris vitianus</i>	Sauvage, 1880	Fiji Islands	?	Syntypes	2
<i>Eleotris klunzingerii</i>	Pfeffer, 1893	Zanzibar	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Holotype (photos)	1
<i>Eleotris aquadulcis</i>	Allen & Coates, 1990	Papua	espèce	Paratypes	3
<i>Eleotris balia</i>	Jordan & Seale, 1905	Japon & Chine	espèce & syno. d' <i>E. oxycephala</i>	Holotype	1
<i>Eleotris eigenmanni</i>	Popta, 1921	Indonesia	synonyme d' <i>E. fusca</i>	lecto et paralectotypes	1 et 2
<i>Eleotris andamensis</i>	Herre, 1939	Andaman Island	espèce	Paratypes	2
<i>Eleotris pellegrini</i>	Maugé, 1984	Madagascar	espèce	Syntypes	1
<i>Eleotris vomerodontata</i>	Maugé, 1984	Madagascar	espèce	Holotype	1

Au cours de cette thèse, j'ai pu avoir accès à **33 types** d'*Eleotris* de l'Indo-Pacifique soit 23 noms d'espèces répertoriées sur les 34 issus de la littérature (Tableau 2). En effet, parmi ces derniers, certains types ont été perdus ou sont non-existants ; tandis que d'autres présentent des erreurs d'étiquetage (nom de l'espèce ou statut erroné). Dans ces conditions, j'ai pu observer en totalité 7 holotypes⁴, 17 syntypes, 1 possible syntype, 5 paratypes, 2 paralectotypes, 1 lectotype possible et 1 type possible présents dans les musées de France (MNHN⁵), des Pays-Bas (RMNH⁶), d'Allemagne (SMF⁷, SMNS⁸ et ZMH⁹), d'Australie (WAM¹⁰), du Royaume-Uni (BMNH¹¹) et des USA (CAS-SU¹² et USNM¹³) (Fig. 1 & Tableau 3).

Tableau 3 : Liste des types observés issus des collections muséales

Musées	Types
MNHN	<i>E. vomerodentata</i> - Holotype [MNHN 1984-0803] ; <i>E. pellegrini</i> - Syntype [MNHN 1932-0108] ; <i>E. niger</i> - Syntype [MNHN A-1578] ; <i>E. sandwicensis</i> - 1 Syntype [MNHN 271-6-19-1], 1 Syntype [MNHN 271-6-19-2], 2 Syntypes [MNHN 271-6-19-3], 1 Syntype [MNHN 271-6-19-4] ; <i>E. vitianus</i> - 2 Syntypes [MNHN 271-6-26-1]
RMNH	<i>Culius macrolepis</i> - 2 Syntypes [RMNH 4759] ; <i>E. melanura</i> - Type ? [RMNH 5182] ; <i>E. melanosoma</i> - 2 Syntypes [RMNH 4815] ; <i>C. macrocephalus</i> - Holotype [RMNH 4757] ; <i>C. insulindicus</i> - 2 Syntypes [RMNH 4804] ; <i>E. acanthopoma</i> - Holotype [RMNH 25934]
SMF	<i>E. eigenmanni</i> - Lectotype ? [SMF 6594] et 2 Paralectotypes [SMF 6595-99]
SMNS	<i>E. pseudoacanthopomus</i> - Holotype [SMNS 10595] (photos)
ZMH	<i>E. klunzingerii</i> - Holotype [ZMH-412]
WAM	<i>E. aquadulcis</i> - 3 Paratypes [WAM 29608.002]
BMNH	<i>E. oxycephala</i> - Possible syntype [BMNH 2015.4.8.1] ; <i>E. soaresi</i> - 2 Syntypes [BMNH 1856.3.18.26-27] ; <i>E. fornasini</i> - Holotype [BMNH 1852.9.13.179]
CAS-SU	<i>E. andamensis</i> - 2 Paratypes [CAS-SU 16968]
USNM	<i>E. balia</i> - Holotype [USNM 52082]

⁴ Parmi les 7 holotypes, le spécimen de *E. klunzingerii* a été observé par le biais de photos de très bonnes qualités envoyées par le musée du ZMH.

⁵ MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris

⁶ RMNH : Rijksmuseum van Natuurlijke Historie, Leiden

⁷ SMF : Senckenberg Forschungsinstitut und Naturmuseum, Frankfurt

⁸ SMNS : Staatliches Museum für Naturkunde, Stuttgart

⁹ ZMH : Zoological Museum Hamburg

¹⁰ WAM : Western Australian Museum, Perth, Western Australia

¹¹ BMNH : British Museum Natural History, London

¹² CAS-SU : California Academy of Sciences (San Francisco) specimens received from Stanford University, Palo Alto, California

¹³ USNM : United States National Museum, Washington D.C.

Par la suite, tous les types ont été mesurés, photographiés et radiographiés (quand cela était possible). Le statut de chaque spécimen a été ensuite validé et/ou corrigé. Et ce, grâce à l'étude morpho-méristique suivante.



Figure 1 : Carte situant les collections muséales avec lesquelles nous avons collaborées

III. Etude morpho-méristique du genre *Eleotris* de l'Indo-Pacifique

1. Spécimens adultes

Les **critères morpho-méristiques** tels que la forme du corps, le nombre de rayons sur les nageoires pectorales – dorsales – anale – caudale ainsi que le nombre d'écailles sur la ligne latérale ne permettent pas toujours de distinguer les espèces entre elles. Le critère discriminant chez les *Eleotris* est la présence de **papilles sensorielles céphaliques sur l'opercule et sous les yeux**. En effet, elles forment des « dessins » qui permettent de distinguer (dans presque tous les cas) les espèces ou des groupes d'espèce entre elles. Les critères méristiques complètent

ensuite utilement la diagnose. Néanmoins, ces papilles ne sont pas visibles lorsque les spécimens sont vivants, en raison de la présence de mucus sur la totalité du corps ; seule la mise en alcool permet de les faire ressortir. Une **série de radiographies** a aussi été entreprise afin d'observer le **nombre de vertèbres**.

Pour les critères basés sur les papilles sensorielles céphaliques, nous avons suivi les travaux de l'empereur Akihito (1967) et utilisé la terminologie développée par Sanzo (1911) avec les modifications employées par Miller & Wongrat (1991) puis, Pezold & Cage (2001). Pour les critères morpho-méristiques « classiques », nous avons suivi la méthodologie développée par Keith et al. (2012). Tous ces critères sont décrits ci-dessous.

Les spécimens types observés ainsi que ceux échantillonnées lors de nos missions ont tous subi le même protocole : première identification à partir des papilles sensorielles puis analyse morpho-méristique basée sur 32 critères. Tout ceci nous permettant d'obtenir un **clé de détermination** pour les *Eleotris* de l'Indo-Pacifique.

a. Les papilles sensorielles céphaliques

Le 1^{er} critère se base sur les lignes formées par les **papilles sensorielles céphaliques sur l'opercule**. Elles sont au nombre de trois : la ligne transversale est notée *ot* tandis que la supérieure et l'inférieure sont notées respectivement *os* et *oi* (d'après Pezold & Cage 2001). Selon comment se rejoignent ces trois lignes, deux patterns sont observés : soit les lignes *os* et *oi* se rejoignent près de l'opercule et on parlera d'un pattern dit « fermé » soit elles ne se rejoignent pas et auquel cas se sera un pattern « ouvert » (Fig. 2).

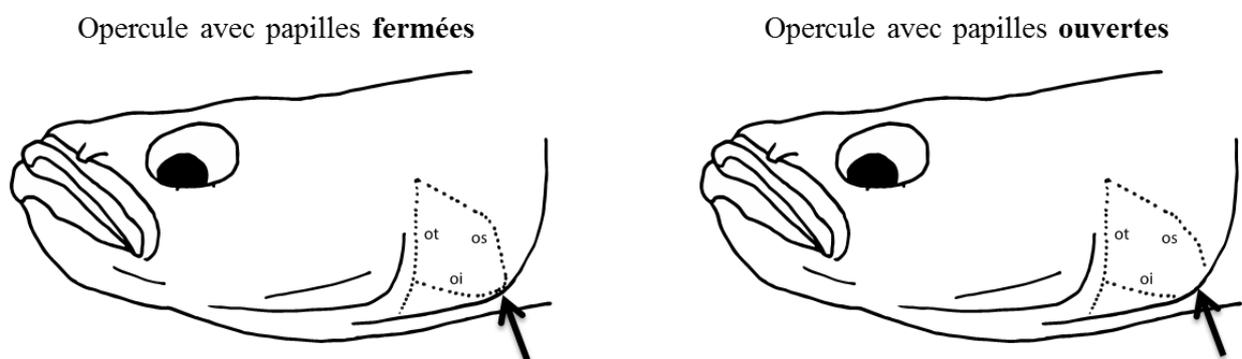


Figure 2 : Schématisation des lignes formées par les papilles sensorielles céphaliques sur l'opercule

Le 2nd critère est basé sur les lignes formées par les **papilles sensorielles céphaliques infraoculaires** (sous l'œil). Deux types de lignes sont présentes : les deux principales horizontales sont notées *b* et *d* ; les verticales sont notées de 1 à *n*. L'analyse des patterns formés par ces lignes sont décrits de la manière suivante : si les lignes verticales 2, 4 et 6 coupent la ligne horizontale *d*, alors on obtient la formule « 2.4.6 » pour le pattern en question. Sur la totalité des spécimens consultés, cinq patterns de papilles sont observés selon les lignes verticales (de 1 à 7) qui traversent la ligne horizontale *d* ; et ces derniers sont classés en tenant compte du 1^{er} critère de papilles (« fermé » ou « ouvert ») (Fig. 3).

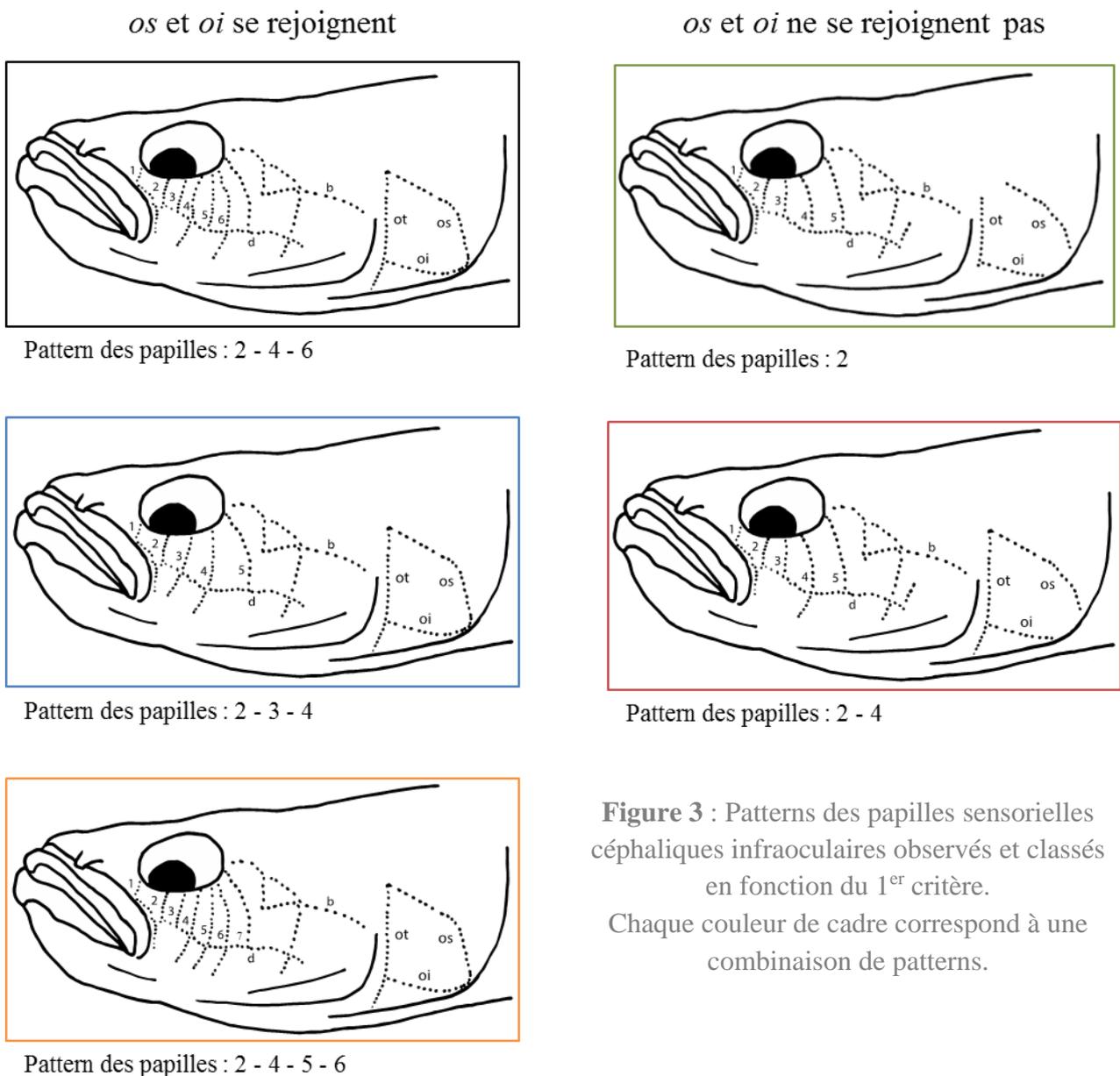


Figure 3 : Patterns des papilles sensorielles céphaliques infraoculaires observés et classés en fonction du 1^{er} critère. Chaque couleur de cadre correspond à une combinaison de patterns.

b. Les critères morpho-méristiques

Aux critères de papilles ont ensuite été ajoutés **32 critères morpho-méristiques** « classiques » pour distinguer les espèces :

- Le premier critère concerne le sexe de l'individu : Femelle (F), Mâle (M), indéterminé car individu trop jeune (Jv : pour juvénile).
- Le second critère est obtenu grâce à des radiographies (Rayons X) permettant de pouvoir déterminer le nombre de vertèbres pour chaque spécimen radiographiés (*i.e.*, seulement 24 spécimens) (Annexe 1).
- Les 20 suivants sont liés à différentes mesures de parties du corps telles que la longueur totale (LT) et standard (LS) ou la longueur de la tête (HL). La mesure du BDL est seulement effectuée sur les mâles et sera donc notée BDM. Toutes les mesures sont ensuite converties en pourcentage par rapport à la longueur standard de l'individu (*i.e.*, annotation %HL) (Fig. 4).
- 5 autres critères concernent le comptage du nombre de rayons pour 4 types de nageoires (P – Pectorales, [D₁, D₂ – Dorsales]¹⁴, A – Anale et C – Caudale) (Fig. 4) .
- Et les 5 derniers s'intéressent au nombre d'écaille sur certaines parties du corps (Lse, PD¹⁵, TRB, TRF et ZZ) (Fig. 4).

NB : Le comptage du nombre de dents n'a pas pu être réalisé du fait de la complexité de la dentition des *Eleotris*. Cependant, un pattern général a pu être dégagé, que ce soit pour la mâchoire inférieure ou supérieure, les *Eleotris* présentent une première rangée de grandes canines (Fig. 5A), puis ensuite un amas de nombreuses petites canines (Fig. 5B) réparties de manière non linéaire et une dernière rangée de canines un peu plus grosses (Fig. 5C).

Toutes les mesures ont été effectuées à l'aide d'un pied à coulisse millimétrique numérique (Mitutoyo) ; et les comptages avec une loupe binoculaire. Les radiographies

¹⁴ Chez les *Eleotris*, le nombre de rayons sur la D₁ est fixe (*i.e.*, 6 rayons épineux) ; et pour le D₂ tous les spécimens présentent 1 rayon épineux et 8 mous, excepté pour *E. sandwicensis*. De ce fait, les comptages des rayons des dorsales ne seront pas présentés dans les tableaux qui suivront.

¹⁵ Pour le comptage des écailles pré-dorsales, le nombre de spécimens (autres que les types) observés est inférieur aux autres comptages car avant de réaliser cette étude morpho-méristique, un grand nombre de spécimens échantillonnés sur le terrain ont été utilisés pour l'otolithométrie, détruisant la partie supérieure du crâne.

numériques ont été prises avec un détecteur à écran plat avec des valeurs de 55 à 75 kVp (peak kilovoltage).

Une fois toutes les espèces valides mesurées et répertoriées et, les synonymes révélés, nous avons pu déterminer tous les spécimens collectés par nos soins (Tableau 4) ; les spécimens adultes, pour lesquels cela était possible, ont aussi été « barcodés » (utilisation de méthode « Sanger », cf. chapitre précédent) afin de pouvoir par la suite identifier les post-larves capturées.

L'ensemble des spécimens adultes collectés et identifiés, à partir de l'examen des patterns de papilles sensorielles céphaliques, figurent dans le Tableau 4 avec les localités de collectes. Parmi ceux-ci, pour chaque espèce, un certain nombre de spécimens ont été utilisés pour l'analyse taxonomique complète en complément des types de collections.

2. Post-larves

En plus des spécimens adultes, 274 post-larves dont 22 juvéniles (LS > 24 mm) ont aussi été observées afin de voir si une clé d'identification pouvait aussi être obtenue pour ce stade. Compte tenu de la difficulté d'obtenir des post-larves c'est-à-dire, être présent sur le terrain lors de la remontée en rivière, toutes les localités n'ont pas pu être étudiées et seules les post-larves d'*Eleotris fusca* et d'*E. acanthopoma* ont pu être observées en grande quantité. Au total, nous disposons de 119 post-larve provenant de Moorea, 8 de Rarotonga, 27 de Papua, 26 du Vanuatu, 14 de Nouvelle-Calédonie, 57 des îles Salomon, 21 de La Réunion et, 2 de l'île Maurice. Parmi toute ces post-larves, seulement 209 ont pu être identifiées génétiquement (Tableau 4) et, ce sera sur ces individus que nous nous baserons pour la suite des analyses.

L'identification des post-larves ne peut être basées sur les critères mis en place pour les spécimens adultes. Les papilles sensorielles céphaliques sont très peu visibles voire absentes (surtout pour les infraoculaires) ; si les post-larves sont assez grandes, on peut néanmoins apercevoir les papilles sur l'opercule à l'aide d'une loupe binoculaire.

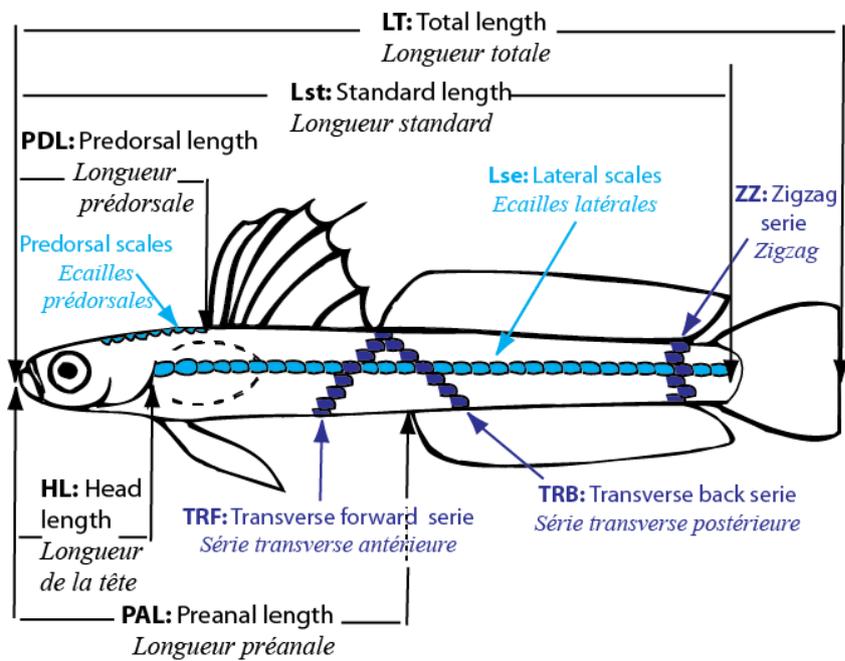
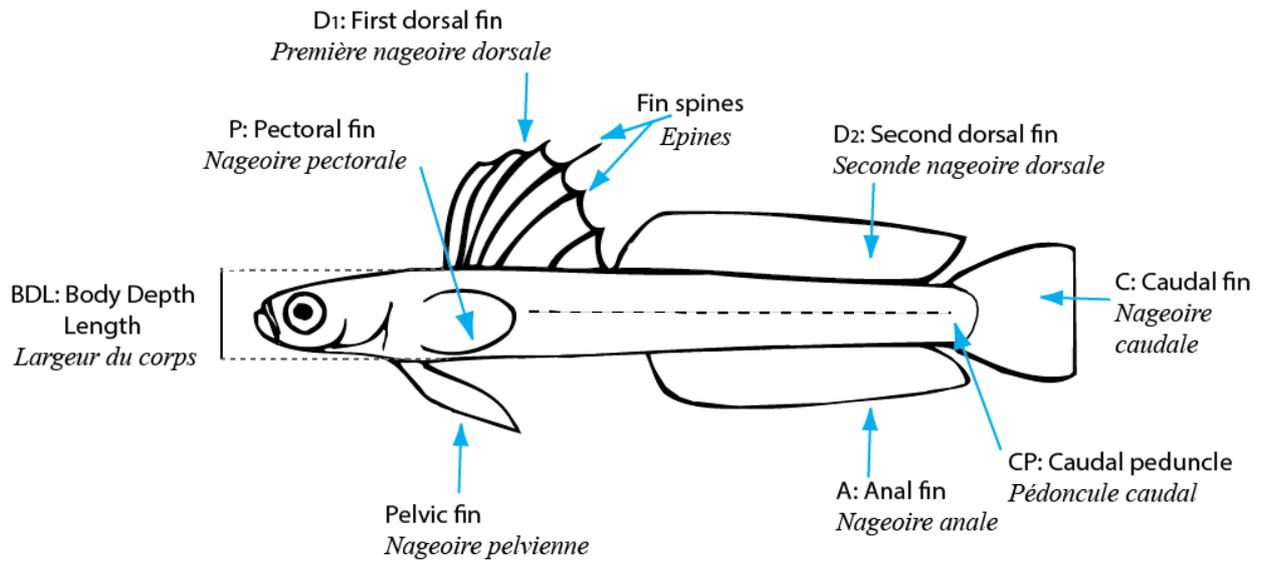
L'ensemble des post-larves a donc été séquencé avec le gène mitochondrial *COI* afin de s'assurer de la bonne identification de chaque individu et ainsi, valider les critères d'identification visuels des post-larves.

Tableau 4 : Représentation du nombre de spécimens adultes entiers (N_E) collectés ainsi que le nombre de post-larves (N_{PL}) dont l'identification a été vérifiée par une analyse moléculaire.

Régions	Pays	Iles	<i>E. fusca</i>		<i>E. acanthopoma</i>		<i>E. cf. pellegrini</i>	<i>E. bosetoi</i>		<i>E. melanosoma</i>		<i>E. cf. melanosoma</i>
			N _E	N _{PL}	N _E	N _{PL}	N _E	N _E	N _{PL}	N _E	N _{PL}	N _E
Centre de l'Océan Pacifique	Iles de la Société	Moorea	32	10	10	50	-	-	-	1	1	-
	Iles Australes	Rurutu	54	-	-	-	-	-	-	1	-	-
	-	Tubuai	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Iles Marquises	Ua huka	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Iles Cook	Rarotonga	13	6	-	-	-	-	-	-	-	-
Sud-Ouest de l'Océan Pacifique	Vanuatu	Maewo	10	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	Santo	16	19	1	-	-	-	-	-	-	-
	-	Malakula	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	Epi	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	Gaua	6	2	9	-	-	-	-	-	-	-
	Nouvelle-Calédonie	Grande Terre	3	14	-	-	-	-	-	-	-	-
	Iles Hoorn	Futuna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fidji	Taveuni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Samoa	Upolu	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Salomon	Choiseul	7	4	-	-	-	2	1	-	-	-
-	Kolobangara	51	47	-	8	-	2	2	2	3	-	
Nord-Ouest de l'Océan Pacifique	Indonésie	Bali	47	-	11	-	-	-	-	7	-	1
	-	Papua	3	23	-	1	-	-	-	-	-	-
	Philippines	Panay	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Iles Caroline	Palau	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Micronésie	Pohnpei	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-
	Iles Ryū-Kyū	Okinawa	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nord-Ouest de l'Océan Indien	Seychelles	Silhouette	-	-	6	-	3	-	-	-	-	-
	Comoros	Anjouan	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-
	-	Moheli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mayotte	Mayotte	3	-	6	-	-	-	-	3	-	-
Sud-Ouest de l'Océan Indien	Mascareignes	Réunion	11	10	4	2	-	-	-	1	-	-
	-	Maurice	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	Madagascar	Madagascar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sous-total			296	140	52	62	3	4	3	13	4	1
Total			436		114		7	11		17		1

a. Distinction en fonction de la pigmentation du corps

La distinction des post-larves d'*E. fusca* et d'*E. acanthopoma* est basée sur un 1^{er} critère qui est celui de la **pigmentation du corps au recrutement**. En effet, selon l'espèce, un pattern de pigmentation est observé, chez *E. acanthopoma* celui-ci est fixe tandis que chez *E. fusca*, il évolue en fonction du temps écoulé après le recrutement (Fig. 6). En effet, lorsque les post-larves arrivent en estuaire, elles sont très peu pigmentées et le deviennent progressivement.



JL: Jaw length
Longueur de la
demi-mâchoire

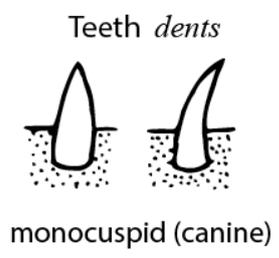
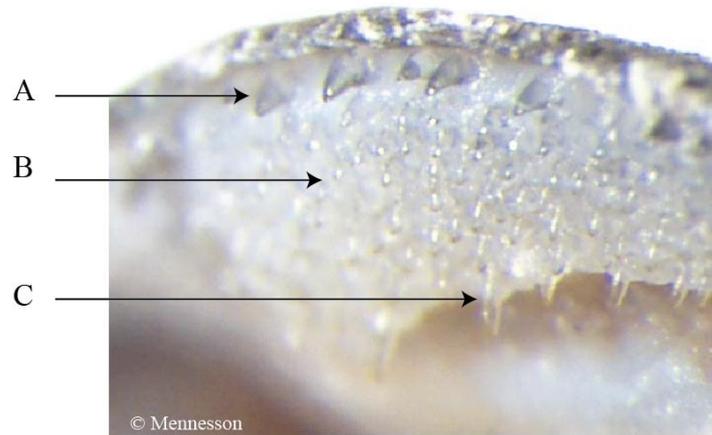


Figure 4 : Illustration des données morpho-méristiques utilisées d'après Keith et al. 2010

Machoire supérieure



Machoire inférieure

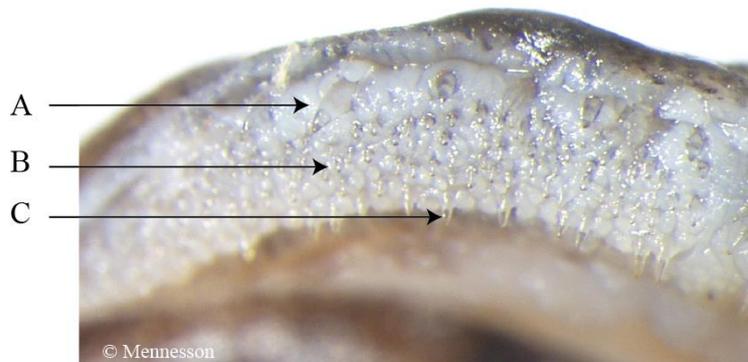


Figure 5 : Photos présentant la dentition général d'un *Eleotris* pour la mâchoire supérieure et inférieure. A : première rangée de grandes canines ; B : amas de petites canines ; C : dernière rangée de canines de tailles moyenne. (© Mennesson)

Les **post-larves d'*E. acanthopoma*** présentent **toujours le même pattern** à savoir un corps blanc nacré avec une très faible pigmentation de la tête et la présence de points noirs à la base de la caudale ; sur la face ventrale, des traits fins et noirs très réguliers sont présents et ce, en pointillés, similaires à une fermeture éclair (Fig. 7). Quant aux **post-larves d'*E. fusca***, **3 types de pigmentation** sont observés (Fig. 7). En effet, les post-larves sont pigmentées de manière plus ou moins intense sur la totalité du corps et à la base de la caudale, un amas de tâches noires est présent. Sur la face ventrale, les individus présentent, tout comme les *E. acanthopoma*, une ligne de longs traits en pointillés mais de manière irrégulière. Cependant, chez les post-larves les plus foncées, ces lignes sont matérialisées par des tâches et non des traits.

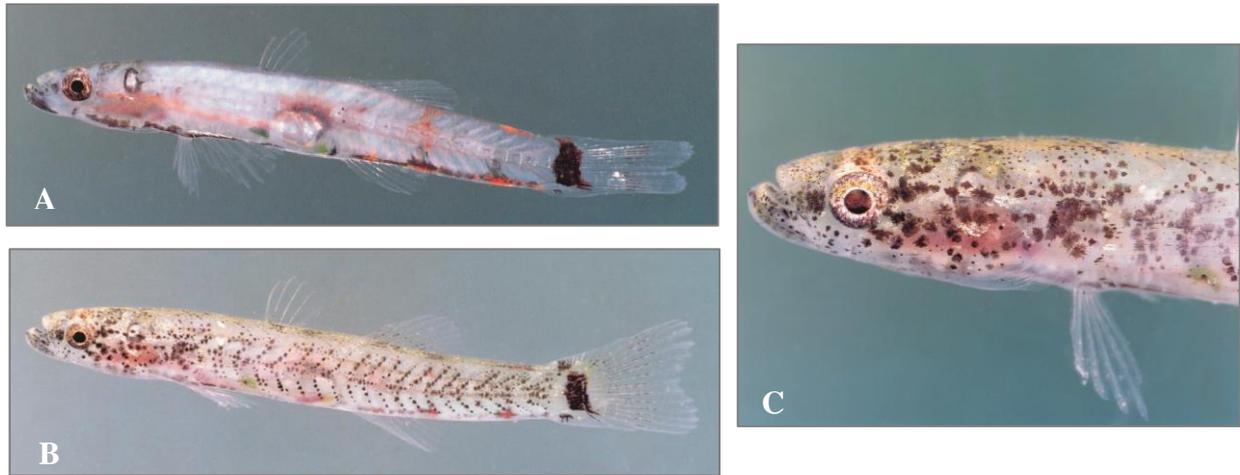


Figure 6 : Photos de post-larves *in situ* d'*E. fusca* montrant une différence de pigmentation en fonction du temps. A : absence de pigments sur le corps excepté à la base de la caudale et sur la face ventrale ; B et C : pigmentation prononcée de la tête et du corps. (© Keith)

Dans la littérature est aussi présente la description des post-larves d'*E. melanosoma*. Ces dernières sont fortement pigmentées, des tâches/points sont visibles à la base de la caudale et des traits/tâches irrégulier(e)s en pointillé(e)s sont discernables sur la face ventrale (Fig. 8). Trois post-larves et un juvénile de cette espèce ont pu être observées, et tous présentaient le pattern décrit par Maeda & Tachihara (2005).

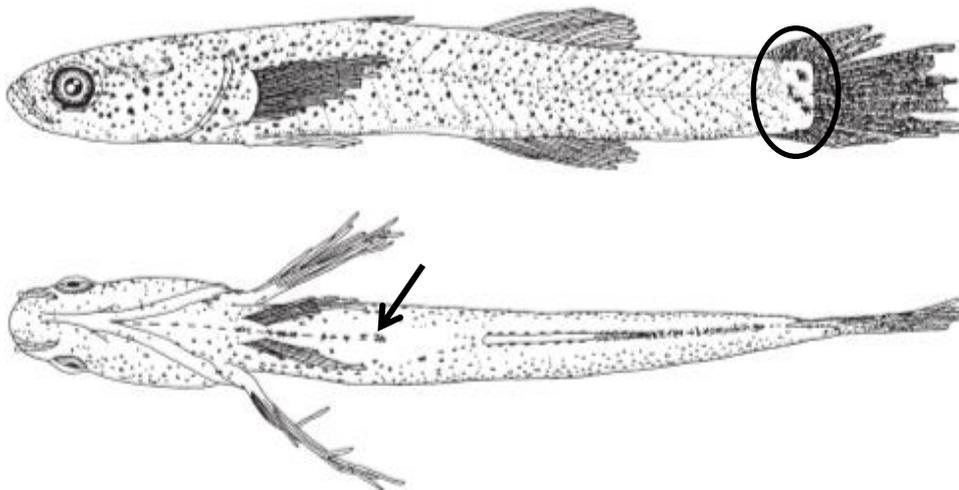


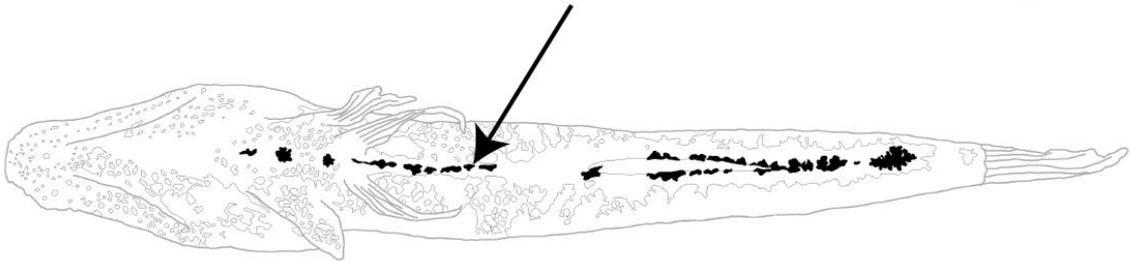
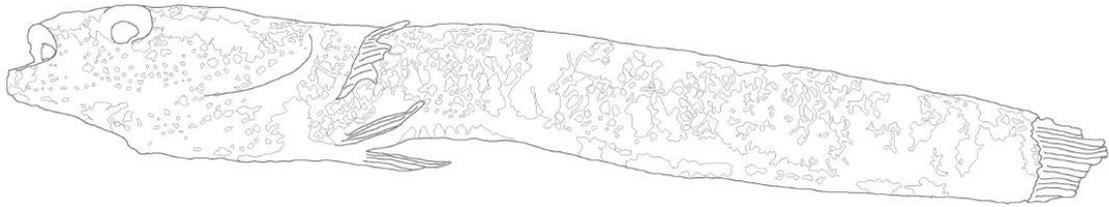
Figure 8 : Dessins illustrant la pigmentation des post-larves d'*Eleotris melanosoma* (Maeda & Tachihara 2005)

Larve : *Eleotris fusca*

Couleur : marron

Ile : Papua

Longueur Standard (LS) : 17 mm



Larve : *Eleotris fusca*

Couleur : blanche

Ile : Vanuatu

LS : 20,11 mm

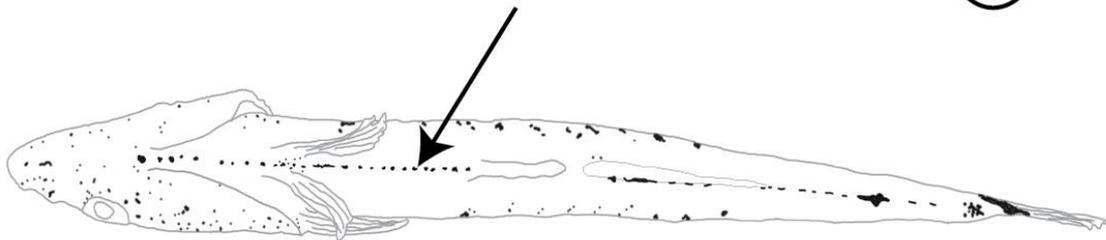
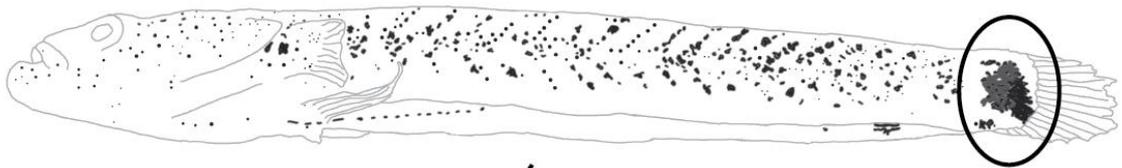


Figure 7 : Planche de dessins accompagnés de photos illustrant les 3 types de pigmentation des post-larves chez *E. fusca* et la pigmentation chez des *E. acanthopoma*. (© Mennesson)

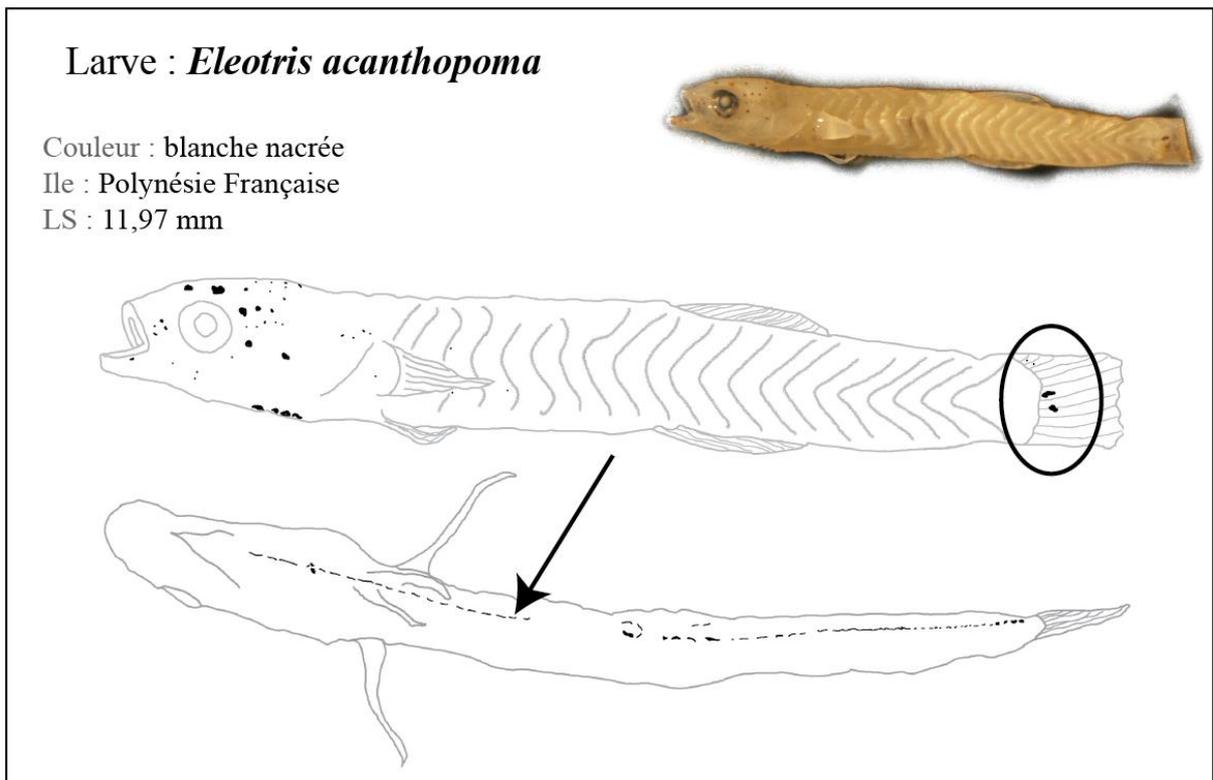
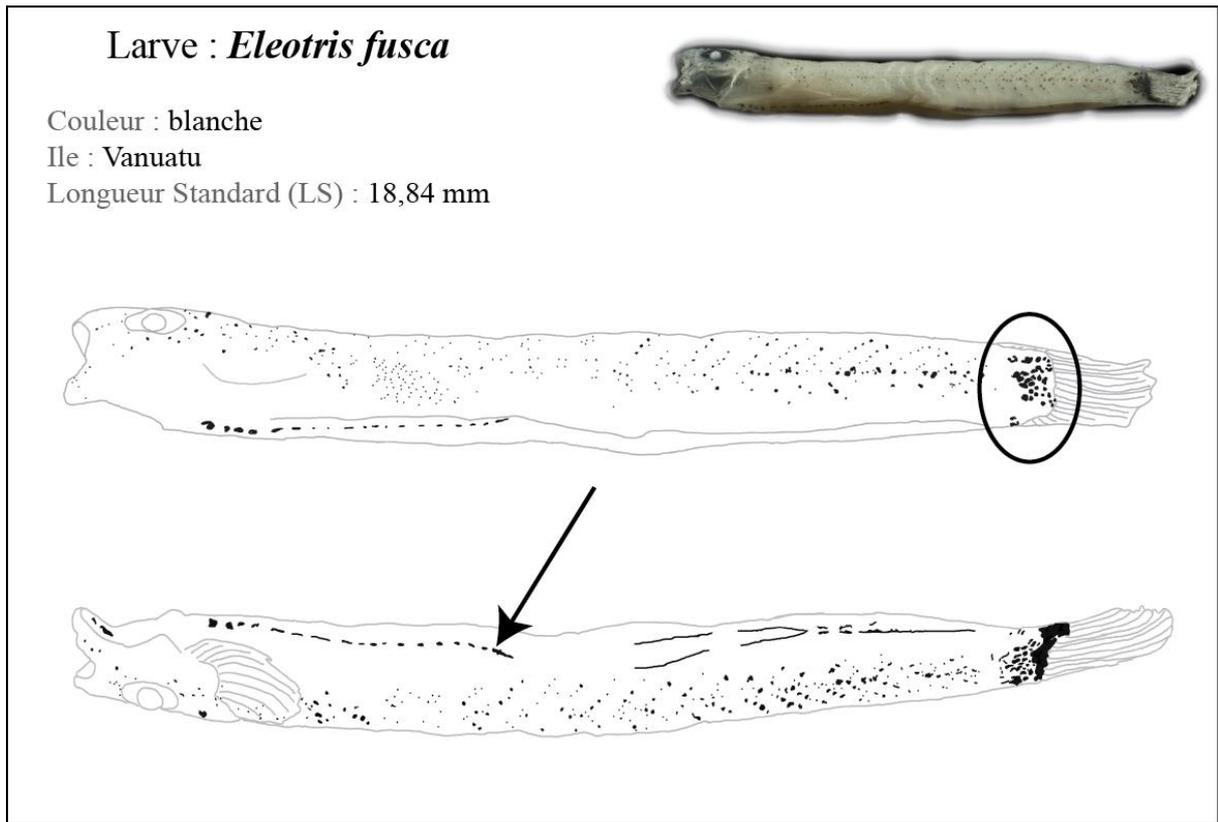


Figure 7 : Planche de dessins accompagnés de photos illustrant les 3 types de pigmentation des post-larves chez *E. fusca* et la pigmentation chez des *E. acanthopoma*. (© Mennesson)

b. Distinction en fonction de la taille

Nous avons constaté, tout comme Maeda & Tachihara (2005) et Corbarieu (ARDA, 2008), que les longueurs standard (LS) des post-larves au recrutement sont différentes entre *E. fusca* et *E. acanthopoma*. En effet, *E. fusca* présente des LS nettement supérieures à celle d'*E. acanthopoma* ($W = 3310$, $p\text{-value} < 2.2 \cdot 10^{-16}$). Ainsi, en plus de la pigmentation, nous pouvons ajouter le paramètre de la taille pour distinguer les espèces : les post-larves d'*E. acanthopoma* ont une LS comprise entre 10 et 14 mm alors que les *E. fusca* sont au-dessus de 15 mm (Fig. 9).

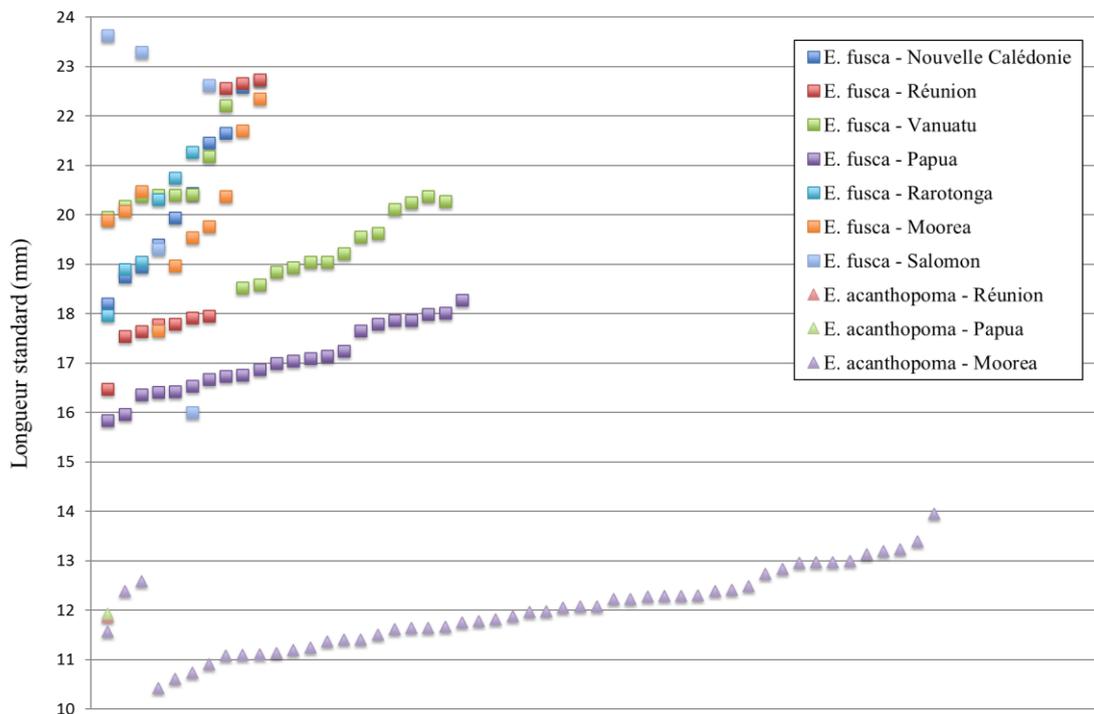


Figure 9 : Graphique présentant la longueur standard (en mm) en fonction des deux espèces d'*Eleotris* : *fusca* (■) et *acanthopoma* (▲) et des localités de capture

Les post-larves d'*E. acanthopoma* présenteront toujours le même pattern *i.e.*, un corps nacré avec une très faible pigmentation de la tête, la présence de quelques points noirs à la base de la caudale et une longueur standard inférieure à 15 mm. Les post-larves d'*E. fusca* peuvent présenter 3 patterns de pigmentations cependant, ils présenteront toujours un amas de tâches au niveau de la caudale et seront toujours d'une longueur standard supérieure à 15 mm. Et seule une pigmentation forte permettra de distinguer une post-larve d'*E. melansoma* de l'une de ces dernières.

La détermination des post-larves par le séquençage « Sanger » du gène *COI* (Barcoding), la pigmentation et la taille nous a permis de finaliser la détermination des spécimens collectés. A partir des critères morpho-méristiques observés sur les types, les spécimens adultes et les post-larves collectés, nous avons pu réviser la taxonomie du genre *Eleotris* dans l'Indo-Pacifique.

IV. Révision taxonomique du genre *Eleotris* dans l'Indo-Pacifique

1. Identification à partir des papilles sensorielles

Dans un premier temps, à partir des listes issues des Tableau 1 & 2, nous avons classé les types et les spécimens en fonction des patterns de papilles sensorielles céphaliques (Fig. 10). Un total de **5 combinaisons de pattern de papilles sensorielles** en ressort :

- La 1^{ère} combinaison « fermé ; 2.4.6 » (cadre **noir**, cf. Fig. 3) permet de regrouper les noms d'espèce d'*Eleotris* suivants : *E. fusca*, *E. fornasini*, *E. niger*, *E. vitianus*, *E. andamensis*, *E. klunzingerii* et *E. n. sp.* (espèce capturée aux îles Salomon).
- La 2^{nde} combinaison « fermé ; 2.3.4 » (cadre **bleu**, cf. Fig. 3) permet de regrouper *E. melanosoma*, *E. cf. melanosoma* (espèce capturée en Indonésie), *E. soaresi*, *E. pseudoacanthopomus*, *E. melanura*, *Culius macrocephalus*, *C. insulindicus* et *C. macrolepis*.
- La 3^{ème} combinaison « ouvert ; 2.4 » (cadre **rouge**, cf. Fig. 3) qui regroupe *E. acanthopoma*, *E. mauritiana*, *E. sandwicensis*, *E. aquadulcis*, *E. vomerodentata*, *E. pellegrini* et *E. cf. pellegrini* (espèce capturée à Madagascar et aux Seychelles).
- La 4^{ème} combinaison « fermé ; 2.4.5.6 » (cadre **orange**, cf. Fig. 3) composé de seulement un type, *E. eigenmanni*.
- La 5^{ème} combinaison « ouvert ; 2 » (cadre **vert**, cf. Fig. 3) regroupant *E. oxycephala* et *E. balia*.

A partir de ces premiers résultats, nous pouvons voir que 3 noms d'espèce ne sont pas placés avec l'espèce dont ils sont supposés être synonymes selon Eschmeyer (CAS) et Kottelat (2013) (Tableau 2) *i.e.*, *E. soaresi*, *E. pseudoacanthopomus* et *E. melanura* ; et *E. eigenmanni* est une espèce à part. Nous avons complété l'analyse des papilles sensorielles par l'étude des critères morpho-méristiques définis précédemment (Tableaux 5 à 19).

2. Résultats de l'identification à partir des critères morpho-méristiques

Afin de faciliter la lecture et la compréhension des différentes observations morpho-méristiques, nous allons présenter les résultats en fonction des 5 combinaisons des patterns de papilles sensorielles.

a. Combinaison « fermé ; 2.4.6 », le complexe « fusca »

Les noms d'espèce d'*Eleotris* présentant cette combinaison sont au nombre de 7 dans nos échantillons ; parmi ceux-ci 4 sont répertoriés par Eschmeyer (CAS) et Kottelat (2013) comme synonymes d'*E. fusca* (*E. fornasini*, *E. niger*, *E. vitianus* et *E. klunzingerii*), *E. andamensis* est répertoriée comme une espèce valide et, une espèce que nous avons capturée aux îles Salomon, *E. n. sp.* Salomon qui se détache du reste et que nous avons décrit comme une nouvelle espèce et nommée *E. bosetoi* (Mennesson et al. 2016) (voir chapitre suivant). Lors de nos analyses moléculaires (Chapitre 4), qui confirment la validité d'*E. bosetoi*, nous avons découvert deux entités sous le nom d'*E. fusca* et c'est pourquoi, nous distinguerons *E. fusca* (répartition large) et *E. cf. fusca* (endémique de l'océan Indien) dans nos tableaux.

Au total pour la combinaison « fermé ; 2.4.6 », nous avons mesuré : 13 *E. cf. fusca*, 19 *E. fusca*, 7 *E. bosetoi*, l'holotype d'*E. fornasini*, le syntype d'*E. niger*, 2 syntypes d'*E. vitianus*, 2 paratypes d'*E. andamensis* et l'holotype d'*E. klunzingerii*.

Les radiographies (Annexe 1) effectuées sur *E. bosetoi*, *E. fornasini* et un spécimen d'*E. fusca*, nous indiquent que ces espèces présentent **24 vertèbres**, une vertèbre de plus est trouvée chez *E. andamensis*.

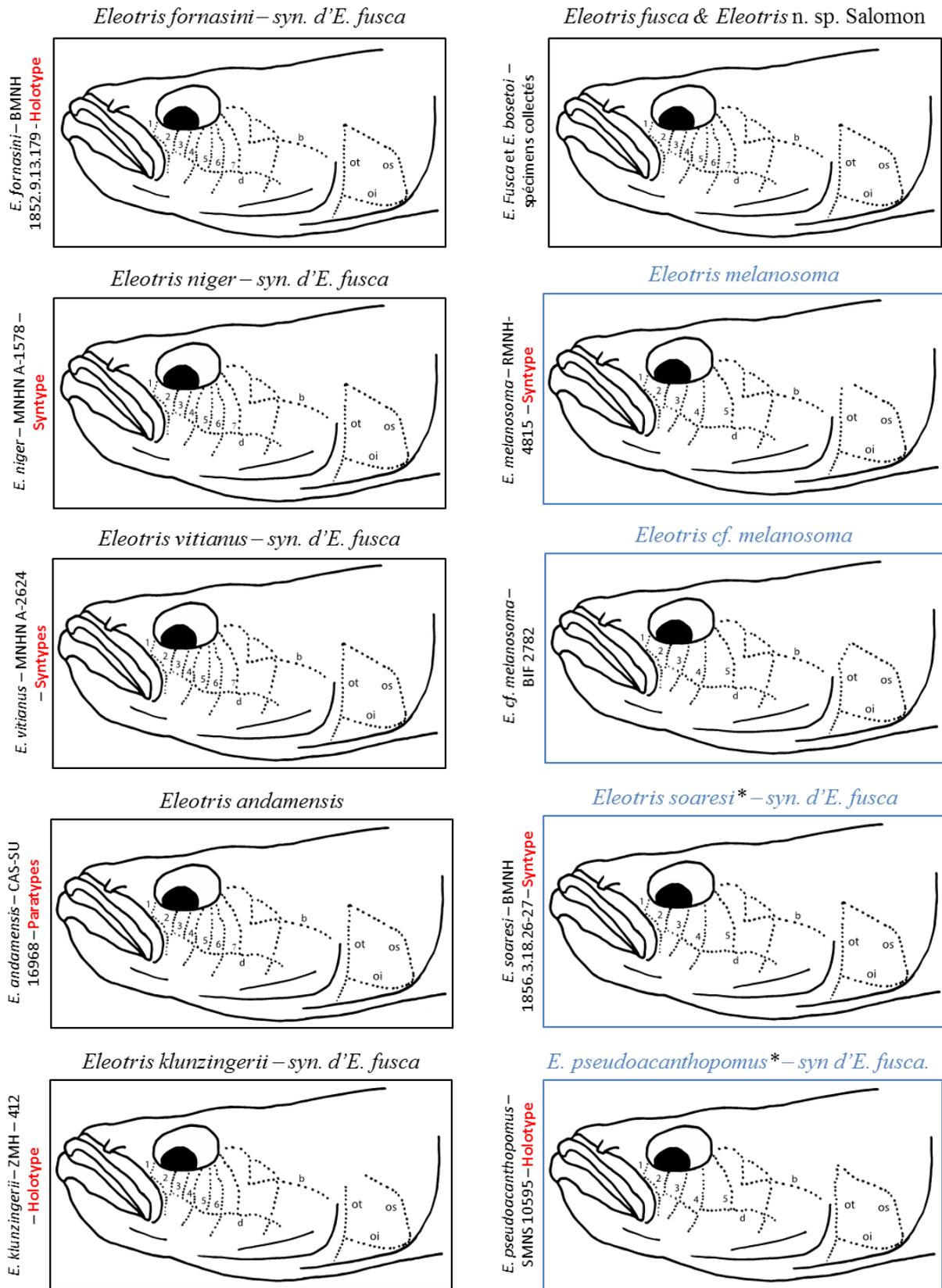


Figure 10 : Schématisation des 5 combinaisons de patterns de papilles sensorielles céphaliques retrouvés chez les types et les spécimens observés. Chaque cadre de couleur correspondant à une combinaison (cf. Fig. 3). Les noms sont donnés avec les synonymies supposées par Eschmeyer (CAS) et Kottelat (2013). Une étoile * est mise aux espèces pour lesquelles la synonymie supposée n'est pas en adéquation avec les papilles. (© Mennesson)

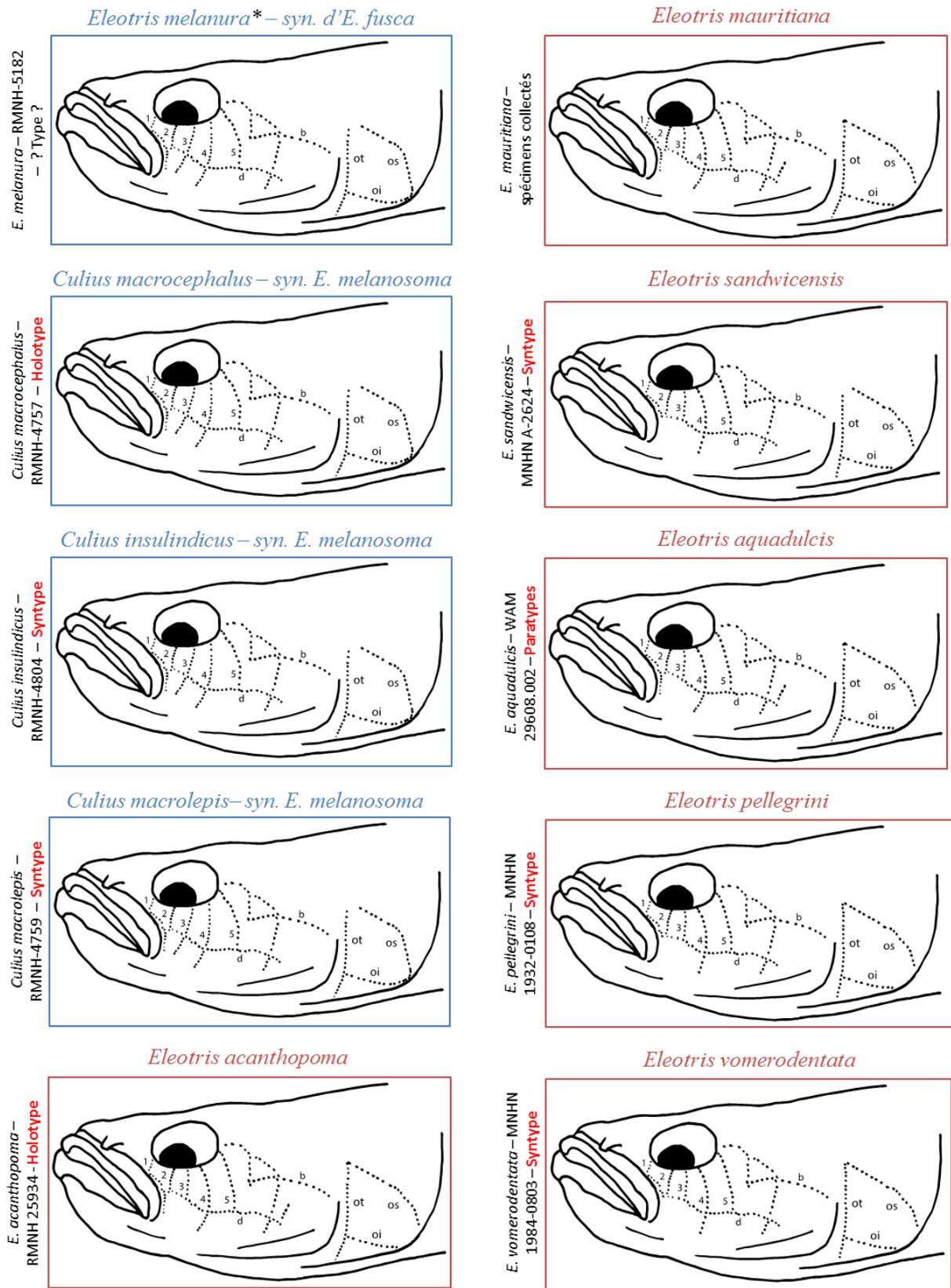


Figure 10 : Schématisation des 5 combinaisons de patterns de papilles sensorielles céphaliques retrouvés chez les types et les spécimens observés. Chaque cadre de couleur correspondant à une combinaison (cf. Fig. 3). Les noms sont donnés avec les synonymies supposées par Eschmeyer (CAS) et Kottelat (2013). Une étoile * est mise aux espèces pour lesquelles la synonymie supposée n'est pas en adéquation avec les papilles. (© Mennesson)

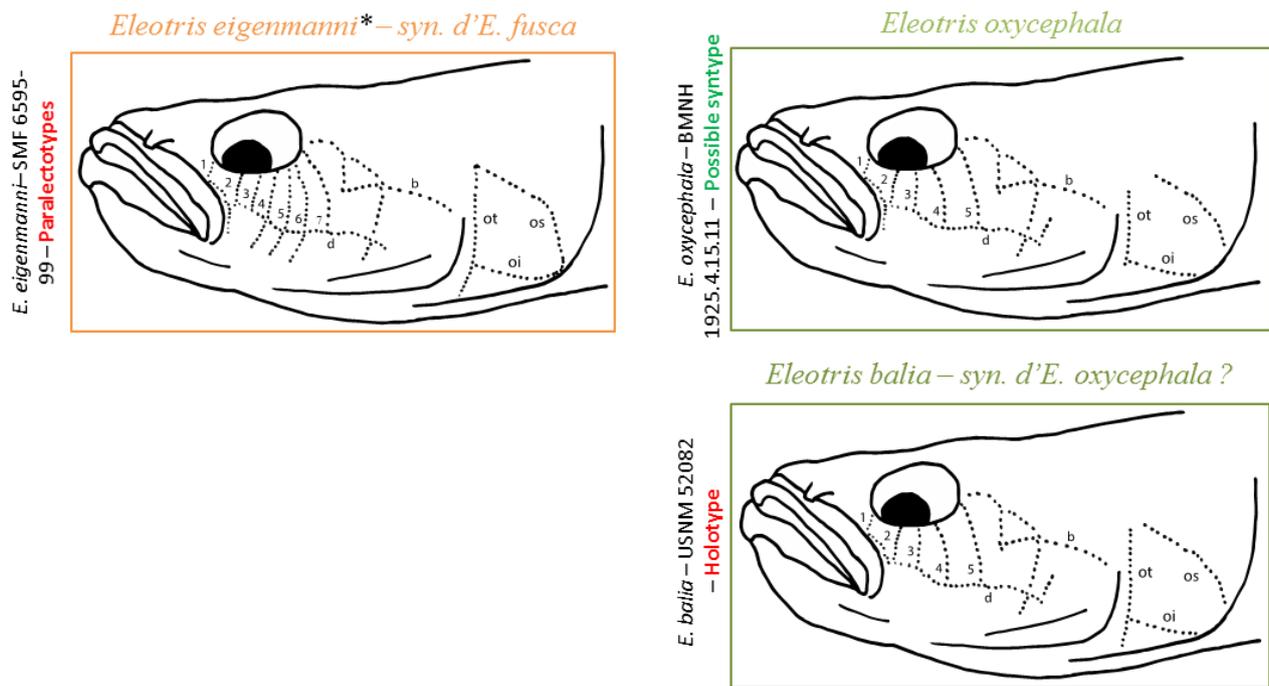


Figure 10 : Schématisation des 5 combinaisons de patterns de papilles sensorielles céphaliques retrouvés chez les types et les spécimens observés. Chaque cadre de couleur correspondant à une combinaison (cf. Fig. 3). Les noms sont donnés avec les synonymies supposées par Eschmeyer (CAS) et Kottelat (2013). Une étoile * est mise aux espèces pour lesquelles la synonymie supposée n'est pas en adéquation avec les papilles. (© Mennesson)

A l'examen des critères morpho-méristiques (Tableau 5), seul *E. bosetoi* se dégage des autres sans ambiguïté par le nombre de rayons au niveau des pectorales (*E. bosetoi*, P=16-17 vs. P=18 pour les autres) (Tableau 7), le nombre d'écaillés sur la ligne latérale (*E. bosetoi*, Lse=42-46 vs. Lse=53-67), sur la série transverse postérieure (*E. bosetoi*, TRB=11-13 vs. TRB=13-21) et sur la série zigzag (*E. bosetoi*, ZZ=9-11 vs. ZZ=12-17) (Tableau 6).

Ainsi, d'après tous les critères morpho-méristiques utilisés, deux espèces seraient taxonomiquement valides dans ce groupe « fermé ; 2.4.6 » : *E. bosetoi* et *E. fusca* ayant pour synonymes *E. fornasini*, *E. niger*, *E. vitianus*, *E. klunzingerii* et *E. andamensis* (qui perd son statut d'espèce valide). Nous confronterons ces résultats aux analyses moléculaire dans le chapitre 4.

			Second Dorsal Length (%SDL)															
			19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
<i>E. cf. fusca</i>	Indien	Mâle							1	1	–	1	2	–	2			
	Indien	Femelle							1	2	3							
<i>E. klunzingeri</i>	Indien	Mâle																1
<i>E. fornasini</i>	Indien	Mâle																1
<i>E. fusca</i>	Indo-P	Mâle				1	–	–	1	–	1	–	2	3	1			
		Femelle				1	–	1	3	–	3	1	–	1				
<i>E. niger</i>	Pacifique	Mâle									1							
<i>E. vitianus</i>	Pacifique	Mâle												1	–	–	–	1
<i>E. andamensis</i>	Indien	Mâle				1	–	–	1									
<i>E. bosetoi</i>	Pacifique	Mâle	1	–	1	–	2											
		Femelle								2	–	–	–	1				

			Anal fin Length (%AL)							
			23	24	25	26	27	28	29	30
<i>E. cf. fusca</i>	Indien	Mâle			2	1	1	1	1	1
	Indien	Femelle			1	3	2			
<i>E. klunzingeri</i>	Indien	Mâle					1			
<i>E. fornasini</i>	Indien	Mâle								1
<i>E. fusca</i>	Indo-P	Mâle	1	–	1	2	–	1	4	
		Femelle		4	2	2	–	2		
<i>E. niger</i>	Pacifique	Mâle		1						
<i>E. vitianus</i>	Pacifique	Mâle					1	–	–	1
<i>E. andamensis</i>	Indien	Mâle	1	–	1					
<i>E. bosetoi</i>	Pacifique	Mâle	2	1	1					
		Femelle	1	–	–	1	–	–	1	

Tableau 5 : Données morphométriques pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4.6 ». Les longueurs sont exprimées en fonction de la longueur standard (en %).

			Caudal Fin Length (%CL)																				
			21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39		
<i>E. cf. fusca</i>	Indien	Mâle									1	–	2	2	–	–	2						
	Indien	Femelle								1	1	1	1	1	–	1							
<i>E. klunzingeri</i>	Indien	Mâle					1																
<i>E. fornasini</i>	Indien	Mâle							1														
<i>E. fusca</i>	Indo-P	Mâle								1	1	1	–	1	3	2							
		Femelle								1	–	–	2	1	1	–	1	1	1	–	1	–	1
<i>E. niger</i>	Pacifique	Mâle				1																	
<i>E. vitianus</i>	Pacifique	Mâle												1	1								
<i>E. andamensis</i>	Indien	Mâle	1	–	–	–	–	–	1														
<i>E. bosetoi</i>	Pacifique	Mâle		1	1	–	–	–	–	1													
		Femelle											2	–	1								

			Preanal Length (%PAL)													
			59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
<i>E. cf. fusca</i>	Indien	Mâle						1	1	1	–	1	2	1		
	Indien	Femelle									1	1	2	2		
<i>E. klunzingeri</i>	Indien	Mâle					1									
<i>E. fornasini</i>	Indien	Mâle					1									
<i>E. fusca</i>	Indo-P	Mâle					1	1	4	2	–	1				
		Femelle			1	–	–	1	2	2	–	–	3	1		
<i>E. niger</i>	Pacifique	Mâle												1		
<i>E. vitianus</i>	Pacifique	Mâle													1	1
<i>E. andamensis</i>	Indien	Mâle							1	–	1					
<i>E. bosetoi</i>	Pacifique	Mâle	1	–	–	1	–	–	–	–	–	1	–	1		
		Femelle										1	2			

			Caudal Peduncle depth (%CPD)									
			10	11	12	13	14	15	16	17		
<i>E. cf. fusca</i>	Indien	Mâle				2	1	3	1			
	Indien	Femelle				4	-	2				
<i>E. klunzingeri</i>	Indien	Mâle								1		
<i>E. fornasini</i>	Indien	Mâle							1			
<i>E. fusca</i>	Indo-P	Mâle		2	-	1	1	3	-	1		
		Femelle				2	7	1				
<i>E. niger</i>	Pacifique	Mâle							1			
<i>E. vitianus</i>	Pacifique	Mâle								2		
<i>E. andamensis</i>	Indien	Mâle			1	-	-	1				
<i>E. bosetoi</i>	Pacifique	Mâle		1	3							
		Femelle			2	1						

Tableau 5 : Données morphométriques pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4.6 ». Les longueurs sont exprimées en fonction de la longueur standard (en %).

			Body Depth at second dorsal fin origin in males (%BDM)														
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
<i>E. cf. fusca</i>	Indien	Mâle					1	2	-	2	1	-	1				
	Indien	Femelle															
<i>E. klunzingeri</i>	Indien	Mâle									1						
<i>E. fornasini</i>	Indien	Mâle											1				
<i>E. fusca</i>	Indo-P	Mâle				1	2	2	2	1	-	1					
		Femelle															
<i>E. niger</i>	Pacifique	Mâle							1								
<i>E. vitianus</i>	Pacifique	Mâle			1												
<i>E. andamensis</i>	Indien	Mâle						1	1								
<i>E. bosetoi</i>	Pacifique	Mâle	3	-	1												
		Femelle															

			Head Length (%HL)												
			27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
<i>E. cf. fusca</i>	Indien	Mâle				1	2	1	1	2					
	Indien	Femelle					3	-	-	2	1				
<i>E. klunzingeri</i>	Indien	Mâle						1							
<i>E. fornasini</i>	Indien	Mâle						1							
<i>E. fusca</i>	Indo-P	Mâle					1	2	3	2	1				
		Femelle					1	2	3	1	1	1	1		
<i>E. niger</i>	Pacifique	Mâle							1						
<i>E. vitianus</i>	Pacifique	Mâle								2					
<i>E. andamensis</i>	Indien	Mâle						1	1						
<i>E. bosetoi</i>	Pacifique	Mâle	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	
		Femelle									1	-	1	1	

			Predorsal Length (%PDL)														
			39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51		
<i>E. cf. fusca</i>	Indien	Mâle			1	-	-	2	1	-	1	1	-	-	1		
	Indien	Femelle	1	-	-	1	1	1	1	-	-	1					
<i>E. klunzingeri</i>	Indien	Mâle						1									
<i>E. fornasini</i>	Indien	Mâle							1								
<i>E. fusca</i>	Indo-P	Mâle						2	2	-	4	-	1				
		Femelle			1	-	2	-	2	3	-	-	2				
<i>E. niger</i>	Pacifique	Mâle									1						
<i>E. vitianus</i>	Pacifique	Mâle										1	1				
<i>E. andamensis</i>	Indien	Mâle			1	-	-	1									
<i>E. bosetoi</i>	Pacifique	Mâle									3	-	-	1			
		Femelle									2	-	-	-	-	1	

			Jaw Length (%JL)							
			6	7	8	9	10	11	12	13
<i>E. cf. fusca</i>	Indien	Mâle	1				1	4	1	
	Indien	Femelle				1	2	2	1	
<i>E. klunzingeri</i>	Indien	Mâle							1	
<i>E. fornasini</i>	Indien	Mâle							1	
<i>E. fusca</i>	Indo-P	Mâle	1	-	-	1	3	3	1	
		Femelle		1	1	2	3	3		
<i>E. niger</i>	Pacifique	Mâle					1			
<i>E. vitianus</i>	Pacifique	Mâle							1	1
<i>E. andamensis</i>	Indien	Mâle				1	1			
<i>E. bosetoi</i>	Pacifique	Mâle			1	-	3			
		Femelle					2	1		

Tableau 5 : Données morphométriques pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4.6 ». Les longueurs sont exprimées en fonction de la longueur standard (en %).

			Anal fin rays (A)				
			4	5	6	7	8
<i>E. cf. fusca</i>	Indien	Mâle					7
	Indien	Femelle					6
<i>E. klunzingeri</i>	Indien	Mâle					?
<i>E. fornasini</i>	Indien	Mâle					1
<i>E. fusca</i>	Indo-P	Mâle					9
		Femelle					10
<i>E. niger</i>	Pacifique	Mâle					1
<i>E. vitianus</i>	Pacifique	Mâle					2
<i>E. andamensis</i>	Indien	Mâle					2
<i>E. bosetoi</i>	Pacifique	Mâle					4
		Femelle					3

			Caudal fin rays (C)				
			12	13	14	15	16
<i>E. cf. fusca</i>	Indien	Mâle					7
	Indien	Femelle					6
<i>E. klunzingeri</i>	Indien	Mâle					1
<i>E. fornasini</i>	Indien	Mâle					1
<i>E. fusca</i>	Indo-P	Mâle					9
		Femelle					10
<i>E. niger</i>	Pacifique	Mâle					1
<i>E. vitianus</i>	Pacifique	Mâle					2
<i>E. andamensis</i>	Indien	Mâle					2
<i>E. bosetoi</i>	Pacifique	Mâle					4
		Femelle					3

			Pectoral fin rays (P)						
			13	14	15	16	17	18	19
<i>E. cf. fusca</i>	Indien	Mâle							7
	Indien	Femelle							6
<i>E. klunzingeri</i>	Indien	Mâle							1
<i>E. fornasini</i>	Indien	Mâle							1
<i>E. fusca</i>	Indo-P	Mâle							9
		Femelle							10
<i>E. niger</i>	Pacifique	Mâle							1
<i>E. vitianus</i>	Pacifique	Mâle							2
<i>E. andamensis</i>	Indien	Mâle							2
<i>E. bosetoi</i>	Pacifique	Mâle						1	
		Femelle				2	1		

Tableau 7 : Evaluation du nombre de rayons constituant les nageoires pectorales (P), anale (A) et caudale (C) pour tous les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4.6 ».

Tableau 6 : Evaluation du nombre d'écailles pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4.6 ». Le nom d'espèce barré signifie que le comptage n'a pu être réalisé.

		Lateral series (Lse)																									
		42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
<i>E. cf. fusca</i>	Indien																	1	4	-	-	1	-	-	-	-	1
	Indien															1	-	-	1	-	2	1	-	1	-	-	1
<i>E. klunzingeri</i>	Indien																										
<i>E. fornasini</i>	Indien																		1								
<i>E. fusca</i>	Mâle												1	-	1	4	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	Femelle												1	-	1	-	-	-	1	1	2	1	1	1	2		
<i>E. niger</i>	Pacifique																										
<i>E. vitianus</i>	Pacifique																										2
<i>E. andamanensis</i>	Indien																										
<i>E. bosetoi</i>	Mâle	1	1	1	-	1																					
	Femelle				1	2																					
		Predorsal midline series (PD)																									
		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
<i>E. cf. fusca</i>	Indien											1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Indien																										1
<i>E. klunzingeri</i>	Indien																										
<i>E. fornasini</i>	Indien																										
<i>E. fusca</i>	Mâle																										
	Femelle																										
<i>E. niger</i>	Pacifique																										
<i>E. vitianus</i>	Pacifique																										
<i>E. andamanensis</i>	Indien																										
<i>E. bosetoi</i>	Mâle	1	1	1	1																						
	Femelle																										

		Transverse backward series (TRB)											Zigzag series (ZZ)								
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>E. cf. fusca</i>	Indien						1	1	1	4	-	1				1	1	1	1	1	2
	Indien				1	1	1	1	2	1							2	2	1	1	
<i>E. klunzingeri</i>	Indien				1											1					
<i>E. fornasini</i>	Indien				1																1
<i>E. fusca</i>	Indo-P				2	2	4	1								2	1	2	3		
	Femelle				5	-	3	1	1							1	2	3	3	1	
<i>E. niger</i>	Pacifique				1															1	
<i>E. vitanus</i>	Pacifique				1	1	1													1	1
<i>E. andamensis</i>	Indien									2										2	
<i>E. bosetoi</i>	Pacifique				1	2	1													1	3
	Femelle				2	1														1	2

Tableau 6 : Evaluation du nombre d'écaillés pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4.6 ».

		Transverse forward series (TRF)																	
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
<i>E. cf. fusca</i>	Indien								1	-	1	-	1	1	1	1	-	-	1
	Indien										1	-	-	2	1	1	1	1	
<i>E. klunzingeri</i>	Indien																		
<i>E. fornasini</i>	Indien								1										
<i>E. fusca</i>	Indo-P				2	-	2	-	1	2	-	1							
	Femelle				1	1	2	1	-	1	-	-	1	2	1				
<i>E. niger</i>	Pacifique								1										
<i>E. vitanus</i>	Pacifique																		
<i>E. andamensis</i>	Indien								1	-	-	2							
<i>E. bosetoi</i>	Pacifique				1	-	-	1	-	1	1								
	Femelle				1	-	1	-	-	-	-	1							

b. Combinaison « fermé ; 2.3.4 », le complexe « melanosoma »

Huit noms d'espèce d'*Eleotris* présentent cette combinaison dans nos échantillons ; parmi eux 3 sont répertoriés par Eschmeyer (CAS) et Kottelat (2013) comme synonymes d'*E. fusca* (*E. soaresi*, *E. pseudoacanthopomus* et *E. melanura*), 3 autres comme synonymes d'*E. melanosoma* (*Culius macrocephalus*, *C. insulindicus* et *C. macrolepis*), puis *E. cf. melanosoma* qui correspond en fait, à un seul spécimen (BIF 2782) que nous avons capturée en Indonésie, et *E. melanosoma*.

Au total pour la combinaison « fermé ; 2.3.4 », 9 *E. melanosoma* dont 2 syntypes, l'holotype d'*E. pseudoacanthopomus*, l'holotype de *Culius macrocephalus*, le type possible d'*E. melanura*, 1 spécimen d'*E. cf. melanosoma* (BIF 2782), 2 syntypes d'*E. soaresi*, 2 syntypes de *C. insulindicus* et 2 autres de *C. macrolepis* ont été mesurés.

Les radiographies (Annexe 1) effectuées sur *E. pseudoacanthopomus*, *E. soaresi*, *E. cf. melanosoma* et sur des spécimens d'*E. melanosoma*, nous indiquent que ces espèces présentent **24 vertèbres**.

L'examen des critères morfo-méristiques permettent de voir qu'au sein du complexe « *melanosoma* », trois entités se distinguent morphologiquement (Tableau 8). Les deux premières se distinguent au sein de ce que l'on appelait *E. melanosoma* où les spécimens de l'océan Indien (que nous nommerons plus loin dans la clé *E. cf. melanosoma* sp2) et du Pacifique diffèrent pour les mesures de %SDL (Indien = 24-29 vs. Pacifique = 28-37), %AL (Indien = 23-26 vs. Pacifique = 27-36), %BDM (Indien = 16-21 vs. Pacifique = 20-28) et %PDL (Indien = 42-46 vs. Pacifique = 46-47). La troisième entité est *E. cf. melanosoma* (que nous appellerons *E.cf. melanosoma* sp3) qui diffère des autres *Eleotris* par son nombre de rayons au niveau des nageoires pectorales ($P=19$ vs. $15 \leq P \leq 18$ pour les autres) (Tableaux 8, 9 et 10).

A ce stade de notre étude, nous considérons que les noms d'espèces qui étaient répertoriés comme synonyme d'*E. melanosoma* le reste (*i.e.*, *Culius macrocephalus*, *C. insulindicus* et *C. macrolepis*) mais nous validons le changement de synonymie d'*E. soaresi*, d'*E. pseudoacanthopomus* et d'*E. melanura* pour le complexe « *melanosoma* ».

En résumé, d'après tous les critères morfo-méristiques utilisés, il semble qu'il y ait plusieurs entités sous le nom d'*E. melanosoma*, une dans l'océan Indien (*E. cf. melanosoma* sp2), une

dans l’océan Pacifique (*E. melanosoma* vrai ?) et une espèce très proche, *E. cf. melanosoma* (*E. cf. melanosoma* sp3). Avec l’apport de la génétique (chapitre suivant), nous pourrions vérifier si nous sommes bien face à trois espèces potentielles.

Tableau 8 : Données morpho-métriques pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.3.4 ». Les longueurs sont exprimées en fonction de la longueur standard (en %).

		Second Dorsal Length (%SDL)													
		24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
<i>E. melanosoma</i>	Indien					1	1								
	Femelle	2	1												
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Pacifique				1	1									
	Mâle														1
<i>E. soaresi</i>	Indien														
<i>E. melanura</i>	Pacifique														
<i>C. macrocephalus</i>	Pacifique														
<i>C. insulindicus</i>	Pacifique														
<i>C. macrolepis</i>	Pacifique														
<i>E. cf. melanosoma</i>	Pacifique														

		Caudal Peduncle depth (%CPD)													
		11	12	13	14	15	16	17	Jaw Length (%JL)						
		10	11	12	13	14									
<i>E. melanosoma</i>	Indien														
	Femelle	1													
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Pacifique														
	Mâle														
<i>E. soaresi</i>	Indien														
<i>E. melanura</i>	Indien														
<i>C. macrocephalus</i>	Pacifique														
<i>C. insulindicus</i>	Pacifique														
<i>C. macrolepis</i>	Pacifique														
<i>E. cf. melanosoma</i>	Pacifique														

		Anal fin Length (%AL)															
		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
<i>E. melanosoma</i>	Indien																
	Femelle																
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Pacifique																
	Mâle																
<i>E. soaresi</i>	Indien																
<i>E. melanura</i>	Indien																
<i>C. macrocephalus</i>	Pacifique																
<i>C. insulindicus</i>	Pacifique																
<i>C. macrolepis</i>	Pacifique																
<i>E. cf. melanosoma</i>	Pacifique																

Tableau 8 : Données morpho-métriques pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.3.4 ». Les longueurs sont exprimées en fonction de la longueur standard (en %). Le nom d'espèce barré signifie que la mesure n'a pu être réalisée.

		Caudal Fin Length (%CL)																						
		17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	
<i>E. melanosoma</i>	Indien											1												
	Femelle				1	1	1																	
	Pacifique									2											1			1
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Pacifique																							1
<i>E. soaresi</i>	Indien						1	1																
<i>E. melanura</i>	Indien																							1
<i>C. macrocephalus</i>	Pacifique																							
<i>C. insulindicus</i>	Pacifique																							
<i>C. macrolepis</i>	Pacifique																							
<i>E. cf. melanosoma</i>	Pacifique																							1

Body Depth at second dorsal fin origin in males (%BDM)

		16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
<i>E. melanosoma</i>	Indien													
	Femelle													
	Pacifique					1	1							1
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Pacifique													
<i>E. soaresi</i>	Indien													
<i>E. melanura</i>	Indien						1							
<i>C. macrocephalus</i>	Pacifique													1
<i>C. insulindicus</i>	Pacifique									2				
<i>C. macrolepis</i>	Pacifique									1				1
<i>E. cf. melanosoma</i>	Pacifique													1

Predorsal Length (%PDL)

		42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
<i>E. melanosoma</i>	Indien					1	1				
	Femelle		1	1	1						
	Pacifique						3	1			
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Pacifique										
<i>E. soaresi</i>	Indien						1				
<i>E. melanura</i>	Indien										1
<i>C. macrocephalus</i>	Pacifique									1	
<i>C. insulindicus</i>	Pacifique									1	
<i>C. macrolepis</i>	Pacifique										
<i>E. cf. melanosoma</i>	Pacifique										1

Head Length (%HL)

		32	33	34	35	36	37	38	39	40
<i>E. melanosoma</i>	Indien									
	Femelle									1
	Pacifique									1
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Pacifique									1
<i>E. soaresi</i>	Indien									2
<i>E. melanura</i>	Indien									1
<i>C. macrocephalus</i>	Pacifique									1
<i>C. insulindicus</i>	Pacifique									2
<i>C. macrolepis</i>	Pacifique									1
<i>E. cf. melanosoma</i>	Pacifique									1

Tableau 8 : Données morpho-métriques pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.3.4 ». Les longueurs sont exprimées en fonction de la longueur standard (en %).

			Preanal Length (%PAL)																				
			63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83
<i>E. melanosoma</i>	Indien	Mâle	1	-	-	-	1																
		Femelle	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1							
	Pacifique	Mâle				1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1							
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Pacifique	Mâle						1															
<i>E. soaresi</i>	Indien	Mâle							1	-	-	-	1										
<i>E. melanura</i>	Indien	Mâle					1																
<i>C. macrocephalus</i>	Pacifique	Mâle				1																	
<i>C. insulindicus</i>	Pacifique	Mâle						1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. macrolepis</i>	Pacifique	Mâle	1	1																			
<i>E. cf. melanosoma</i>	Pacifique	Mâle					1																

Tableau 9 : Evaluation du nombre d'écailles pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4.6 ». Le nom d'espèce barré signifie que le comptage n'a pu être réalisé.

			Transverse forward series (TRF)										
			16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
<i>E. melanosoma</i>	Indien	Mâle											1
		Femelle	1	-	-	1	-	-	-	1			
	Pacifique	Mâle					1	-	1	1	1		
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Pacifique	Mâle											
<i>E. soaresi</i>	Indien	Mâle						1					
<i>E. melanura</i>	Indien	Mâle										1	
<i>C. macrocephalus</i>	Pacifique	Mâle									1		
<i>C. insulindicus</i>	Pacifique	Mâle							1	1			
<i>C. macrolepis</i>	Pacifique	Mâle				1	1						
<i>E. cf. melanosoma</i>	Pacifique	Mâle								1			

			Zigzag series (ZZ)						
			12	13	14	15	16	17	18
<i>E. melanosoma</i>	Indien	Mâle	1	-	-	-	1		
		Femelle					2	-	1
	Pacifique	Mâle	2	1	-	-	1		
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Pacifique	Mâle							
<i>E. soaresi</i>	Indien	Mâle		2					
<i>E. melanura</i>	Indien	Mâle	1						
<i>C. macrocephalus</i>	Pacifique	Mâle		1					
<i>C. insulindicus</i>	Pacifique	Mâle		2					
<i>C. macrolepis</i>	Pacifique	Mâle	1						
<i>E. cf. melanosoma</i>	Pacifique	Mâle		1					

Lateral series (Lse)

	43	44	45	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		
<i>E. melanosoma</i>	Mâle					1																											
	Femelle																																
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Mâle					2																											
	Mâle							1																									
<i>E. soaresi</i>	Mâle																																
<i>E. melanura</i>	Mâle																																
<i>C. macrocephalus</i>	Mâle																																
<i>C. insulindicus</i>	Mâle																																
<i>C. macrolepis</i>	Mâle																																
<i>E. cf. melanosoma</i>	Mâle																																

Predorsal midline series (PD)

	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50													
<i>E. melanosoma</i>	Mâle																																
	Femelle																																
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Mâle																																
	Mâle																																
<i>E. soaresi</i>	Mâle																																
<i>E. melanura</i>	Mâle																																
<i>C. macrocephalus</i>	Mâle																																
<i>C. insulindicus</i>	Mâle																																
<i>C. macrolepis</i>	Mâle																																
<i>E. cf. melanosoma</i>	Mâle																																

Transverse backward series (TRB)

	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<i>E. melanosoma</i>	Mâle									
	Femelle									
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Mâle									
	Mâle									
<i>E. soaresi</i>	Mâle									
<i>E. melanura</i>	Mâle									
<i>C. macrocephalus</i>	Mâle									
<i>C. insulindicus</i>	Mâle									
<i>C. macrolepis</i>	Mâle									
<i>E. cf. melanosoma</i>	Mâle									

Tableau 9 : Evaluation du nombre d'écailles pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4.6 ». Les noms d'espèce et les sexes barrés signifient que les comptages n'ont pu être effectués.

		Pectoral fin rays (P)				
		15	16	17	18	19
<i>E. melanosoma</i>	Indien	Mâle	1	1		
		Femelle		1	2	
	Pacifique	Mâle		4		
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Pacifique	Mâle	1			
<i>E. soaresi</i>	Indien	Mâle			2	
<i>E. melanura</i>	Indien	Mâle		1		
<i>C. macrocephalus</i>	Pacifique	Mâle	1			
<i>C. insulindicus</i>	Pacifique	Mâle		1		
<i>C. macrolepis</i>	Pacifique	Mâle	2			
<i>E. cf. melanosoma</i>	Pacifique	Mâle				1

		Anal fin rays (A)		
		6	7	8
<i>E. melanosoma</i>	Indien	Mâle		2
		Femelle		3
	Pacifique	Mâle		4
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Pacifique	Mâle		1
<i>E. soaresi</i>	Indien	Mâle		2
<i>E. melanura</i>	Indien	Mâle		1
<i>C. macrocephalus</i>	Pacifique	Mâle		1
<i>C. insulindicus</i>	Pacifique	Mâle		2
<i>C. macrolepis</i>	Pacifique	Mâle		2
<i>E. cf. melanosoma</i>	Pacifique	Mâle		1

		Caudal fin rays (C)				
		12	13	14	15	16
<i>E. melanosoma</i>	Indien	Mâle			2	
		Femelle			3	
	Pacifique	Mâle			4	
<i>E. pseudoacanthopomus</i>	Pacifique	Mâle			1	
<i>E. soaresi</i>	Indien	Mâle			2	
<i>E. melanura</i>	Indien	Mâle			1	
<i>C. macrocephalus</i>	Pacifique	Mâle			1	
<i>C. insulindicus</i>	Pacifique	Mâle			2	
<i>C. macrolepis</i>	Pacifique	Mâle			2	
<i>E. cf. melanosoma</i>	Pacifique	Mâle			1	

Tableau 10 : Evaluation du nombre de rayons constituant les nageoires pectorales (P), anale (A) et caudale (C) pour tous les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.3.4 ».

c. Combinaison « fermé ; 2.4.5.6 »

Un seul *Eleotris* présente cette combinaison, *E. eigenmanni*, qui est répertorié comme étant un synonyme d'*E. fusca*. Nous avons pu observer le lectotype ainsi que 2 paralectotypes de cette espèce.

Les radiographies (Annexe 1) effectuées sur les 2 paralectotypes d'*E. eigenmanni*, nous indiquent que cette espèce possède **24 vertèbres**. L'examen des critères morphométriques permettent de voir que cette espèce ne se distingue pas des autres *Eleotris* au niveau des différentes proportions corporelles (Tableau 11). Néanmoins, elle présente 17 rayons aux nageoires pectorales ce qui la distingue d'*E. fusca* (P=18) (Tableau 13) et un grand nombre d'écailles prédorsales (PD=56-58 vs. $PD \leq 54$) (Tableau 12).

E. eigenmanni présentant des papilles sensorielles céphaliques qui n'ont été retrouvées chez aucune autre espèce, nous considérons cette espèce comme **valide**.

Tableau 11 : Données morpho-métriques pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4.5.6 ». Les longueurs sont exprimées en fonction de la longueur standard (en %).

			Second Dorsal Length (%SDL)						
			20	21	22	23	24	25	26
<i>Eleotris eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle		1	-	-	1	1	

			Anal fin Length (%AL)				
			20	21	22	23	24
<i>Eleotris eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle		1	1	1	

			Caudal Fin Length (%CL)										
			19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
<i>Eleotris eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1

			Jaw Length (%JL)				
			11	12	13	14	15
<i>E. eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle		1	1	1	

			Caudal Peduncle depth (%CPD)					
			10	11	12	13	14	15
<i>E. eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle				3		

			Body Depth at second dorsal fin origin in males (%BDM)									
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<i>E. eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle				1	1	-	-	1		

			Head Length (%HL)			
			35	36	37	38
<i>E. eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle	1	-	-	2

			Predorsal Length (%PDL)				
			46	47	48	49	50
<i>E. eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle			1	2	

			Preanal Length (%PAL)										
			61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
<i>E. eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1

Tableau 12 : Evaluation du nombre d'écailles pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4.5.6 ».

			Lateral series (Lse)				
			67	68	69	70	71
<i>E. eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle	1	1	-	1	

			Zigzag series (ZZ)				
			14	15	16	17	
<i>E. eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle		1	2		

			Predorsal midline series (PD)						
			54	55	56	57	58	59	60
<i>E. eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle			2	-	1		

			Transverse backward series (TRB)						
			18	19	20	21	22	23	
<i>E. eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle			1	2			

			Transverse forward series (TRF)						
			21	22	23	24	25	26	
<i>E. eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle				2	1		

Tableau 13 : Evaluation du nombre de rayons constituant les nageoires pectorales (P), anale (A) et caudale (C) pour tous les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4.5.6 ».

			Pectoral fin rays (P)				
			15	16	17	18	19
<i>E. eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle			3		

			Anal fin rays (A)		
			6	7	8
<i>E. eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle			3

			Caudal fin rays (C)				
			12	13	14	15	16
<i>E. eigenmanni</i>	Pacifique	Mâle			3		

d. Combinaison « ouvert ; 2.4 », complexe « acanthopoma »

Les noms d'espèce d'*Eleotris* présentant cette combinaison sont au nombre de 7 dans nos échantillons ; six sont considérées comme étant des espèces valides par Eschmeyer (CAS) et Kottelat (2013) : *E. acanthopoma*, *E. mauritiana*, *E. sandwicensis*, *E. aquadulcis*, *E. pellegrini*, *E. vomerodentata* ; et, un groupe de spécimens, que nous avons capturé dans l'océan Indien, se différenciant de ces dernières, appelés ici : *E. cf. pellegrini*.

Au total pour la combinaison « fermé ; 2.4 », nous avons observé : 22 *E. mauritiana*, 11 *E. acanthopoma* dont l'holotype, un syntype d'*E. pellegrini*, 3 *E. cf. pellegrini*, l'holotype d'*E. vomerodentata*, 3 paratypes d'*E. aquadulcis*, et 5 syntypes d'*E. sandwicensis*.

Les radiographies (Annexe 1) effectuées sur *E. aquadulcis*, *E. pellegrini*, et *E. vomerodentata* nous indiquent que ces espèces présentent **24 vertèbres**. Un doute plane sur le nombre de vertèbres pour *E. mauritiana* (24 ou 25 vertèbres) et pour *E. cf. pellegrini* [MNHN 2007-0204] (23 ou 24 vertèbres). Cependant, un spécimen d'*E. cf. pellegrini*, le spécimen n°13970¹⁶ possède **22 vertèbres** bien que l'examen des critères morpho-méristiques ne montre aucune différence entre les 3 spécimens regroupés sous le nom d'*E. cf. pellegrini* (Tableau 14, 15 et 16).

Nos résultats morpho-méristiques indiquent que *E. mauritiana* et *E. acanthopoma* semblent être la même espèce puisque qu'aucune différence n'est observée. *E. pellegrini* et *E. vomerodentata* sont aussi proches morphologiquement mais se distinguent par une différence de 10 écailles sur la zone prédorsale (PD) et la présence de petites dents sur le vomer pour *E. vomerodentata* (d'où son nom) qui sont absentes chez *E. pellegrini* ; il faut toutefois être prudent puisque nous n'avons qu'un spécimen comparé pour chaque espèce, le type.

Bien que présentant des proportions corporelles relativement proches des autres *Eleotris*, *E. aquadulcis* et *E. sandwicensis* se distinguent de ces derniers par des valeurs extrêmes du nombre d'écailles sur la ligne latérale (respectivement, Lse =37-38 et Lse=75-82), sur la ligne transverse postérieure (TRB=12 et TRB=21-25), sur la ligne zigzag (ZZ=9 et ZZ=19-20) et, seulement pour *E. sandwicensis* sur la zone prédorsale

¹⁶ Dans les tableaux 13, 14 et 15, ce spécimen sera démarqué des 2 autres à l'aide d'un astérisque*.

(PD=59-75) et un rayon supplémentaire sur la seconde dorsale ($D_2 = 1,9$ vs. 1,8 tous les autres).

En résumé, à partir de tous les critères morpho-méristiques, nous confirmons la validité des espèces *E. sandwicensis*, *E. aquadulcis*, *E. pellegrini*, *E. vomerodentata* et *E. acanthopoma* (synonyme *E. mauritiana*).

Les données récoltées pour *E. cf. pellegrini* ne permettent pas pour l'instant de statuer mais il semble un peu différent d'*E. pellegrini*.

Tableau 14 : Données morpho-métriques pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4 ». Les longueurs sont exprimées en fonction de la longueur standard (en %). Le spécimen n° 13970 est marqué par un astérisque *.

			Second Dorsal Length (%SDL)																	
			23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
<i>E. mauritiana</i>	Indien	Mâle		1	-	-	1	1	-	5	2	3	1	-	2	2				
		Femelle			1	1	2													
<i>E. acanthopoma</i>	Pacifique	Mâle	1	-	-	-	1	-	1	3	2	1	-	-	-	1				
		Femelle						1												
<i>E. vomerodentata</i>	Indien	Mâle											1							
<i>E. pellegrini</i>	Indien	Femelle										1								
<i>E. cf. pellegrini</i>	Indien	Mâle															1	1*	-	1
<i>E. aquadulcis</i>	Pacifique	Femelle							1	1	-	-	1							
<i>E. sandwicensis</i>	Pacifique	Mâle						2	-	-	-	1	1	1						

			Anal fin Length (%AL)																
			22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
<i>E. mauritiana</i>	Indien	Mâle					1	3	3	1	2	-	2	3	2	-	-	-	1
		Femelle		1	-	1	-	1	-	-	-	-	1						
<i>E. acanthopoma</i>	Pacifique	Mâle	1	-	1	-	-	1	4	-	2	1							
		Femelle										1							
<i>E. vomerodentata</i>	Indien	Mâle						1											
<i>E. pellegrini</i>	Indien	Femelle										1							
<i>E. cf. pellegrini</i>	Indien	Mâle													1	-	1*	-	1
<i>E. aquadulcis</i>	Pacifique	Femelle								1	1	-	-	-	1				
<i>E. sandwicensis</i>	Pacifique	Mâle				1	-	1	-	-	2	-	1						

			Jaw Length (%JL)														
			9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<i>E. mauritiana</i>	Indien	Mâle	1	2	2	5	3	4	1								
		Femelle	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2		
<i>E. acanthopoma</i>	Pacifique	Mâle		2	-	4	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
		Femelle		1													
<i>E. vomerodentata</i>	Indien	Mâle						1									
<i>E. pellegrini</i>	Indien	Femelle					1										
<i>E. cf. pellegrini</i>	Indien	Mâle					1	2*									
<i>E. aquadulcis</i>	Pacifique	Femelle					1	-	1	1							
<i>E. sandwicensis</i>	Pacifique	Mâle				1	-	1	2	1							

		Caudal Fin Length (%CL)																														
		24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46								
<i>E. mauritiana</i>	Mâle	1	-	1	1	-	-	2	2	5	-	1	2																			
	Femelle				1	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
<i>E. acanthopoma</i>	Mâle	1	-	-	1	-	1	3	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
	Femelle																															
<i>E. vomerodentata</i>	Mâle	1																														
<i>E. pellegrini</i>	Femelle																															
<i>E. cf. pellegrini</i>	Mâle								1	1*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
<i>E. aquadulcis</i>	Femelle								2	-	1																					
<i>E. sandwicensis</i>	Mâle	2	-	-	1	2																										

Tableau 14 : Données morpho-métriques pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4 ». Les longueurs sont exprimées en fonction de la longueur standard (en %). Le spécimen n° 13970 est marqué par un astérisque *. Le nom d'espèce barré signifie que la mesure n'a pu être réalisée.

		Caudal Peduncle depth (%CPD)													
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<i>E. mauritiana</i>	Mâle	4	6	4	2	1	1								
	Femelle	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>E. acanthopoma</i>	Mâle	1	1	1	2	2	-	-	-	-	-	-	-	1	2
	Femelle					1									
<i>E. vomerodentata</i>	Mâle	1													
<i>E. pellegrini</i>	Femelle	1													
<i>E. cf. pellegrini</i>	Mâle	1	-	1	-	1	-	1*							
<i>E. aquadulcis</i>	Femelle	2													
<i>E. sandwicensis</i>	Mâle	4													

		Body Depth at second dorsal fin origin in males (%BDM)																		
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
<i>E. mauritiana</i>	Mâle	1	-	3	2	4	3	1	1	1	1	-	-	-	1	-	-	-	1	
	Femelle																			
<i>E. acanthopoma</i>	Mâle	1	-	-	1	-	-	1	1	2	1	-	-	-	-	1	1	-	-	
	Femelle																			
<i>E. vomerodentata</i>	Mâle	1																		
<i>E. pellegrini</i>	Femelle																			
<i>E. cf. pellegrini</i>	Mâle																			
<i>E. aquadulcis</i>	Femelle																			
<i>E. sandwicensis</i>	Mâle	1	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	

		Lateral series (L-se)																													
		37	38	39	/	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	/	74	75	76	77	78	79	80	81	82
<i>E. mauritiana</i>	Mâle	/	/	/	/	1	1	3	-	-	-	-	-	2	3	3	2	1	2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	Femelle	/	/	/	/	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
<i>E. acanthopoma</i>	Mâle	/	/	1	-	2	2	2	2	2	-	1	1	1																	
	Femelle	/	/	/	1																										
<i>E. vomerodentata</i>	Mâle	/	/	/	/	/	/	/	/	1																					
	Femelle	/	/	/	/	/	/	/	1																						
<i>E. cf. pellegrini</i>	Mâle	/	/	/	/	/	/	/	3*																						
	Femelle	1	2	/	/	/	/	/																							
<i>E. aquadulcis</i>	Mâle	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	Femelle	1	2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
<i>E. sandwicensis</i>	Mâle	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	Femelle	1	2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	

Predorsal midline series (PD)

		Predorsal midline series (PD)																														
		30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	/	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
<i>E. mauritiana</i>	Mâle	/	/	/	/	/	/	/	1	-	-	1	-	1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	Femelle	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
<i>E. acanthopoma</i>	Mâle	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	Femelle	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
<i>E. vomerodentata</i>	Mâle	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1																					
	Femelle	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
<i>E. pellegrini</i>	Mâle	1																														
	Femelle	1*	1	-	-	-	-	-	1																							
<i>E. aquadulcis</i>	Mâle	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	Femelle	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
<i>E. sandwicensis</i>	Mâle	/	/	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Femelle	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	

Transverse forward series (TRF)

		Transverse forward series (TRF)																			
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
<i>E. mauritiana</i>	Mâle	1	-	1	1	1	-	1	2	-	-	1	2	-	2	-	-	1	1		
	Femelle	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1						
<i>E. acanthopoma</i>	Mâle							1	1	2	2	2	2	-	1						
	Femelle																				
<i>E. vomerodentata</i>	Mâle							1													
	Femelle																				
<i>E. cf. pellegrini</i>	Mâle					1*	1	1													
	Femelle																				
<i>E. aquadulcis</i>	Mâle																				
	Femelle																				
<i>E. sandwicensis</i>	Mâle																				
	Femelle																				

Tableau 15 : Evaluation du nombre d'écaïlles pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4 ». Le spécimen n° 13970 est marqué par un astérisque *. Le nom d'espèce barré signifie que le comptage n'a pu être réalisé.

Tableau 15 : Evaluation du nombre d'écailles pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4 ». Le spécimen n° 13970 est marqué par un astérisque *.

			Transverse backward series (TRB)													
			12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
<i>E. mauritiana</i>	Indien	Mâle			1	1	4	3	3	1						
		Femelle				1	–	1	1							
<i>E. acanthopoma</i>	Pacifique	Mâle				1	7	1								
		Femelle				1										
<i>E. vomerodentata</i>	Indien	Mâle					1									
<i>E. pellegrini</i>	Indien	Femelle						1								
<i>E. cf. pellegrini</i>	Indien	Mâle			2	1*										
<i>E. aquadulcis</i>	Pacifique	Femelle	3													
<i>E. sandwicensis</i>	Pacifique	Mâle									1	1	1	1	1	1

			Zigzag series (ZZ)											
			9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>E. mauritiana</i>	Indien	Mâle	1	1	11	2	1	1	1					
		Femelle	1	–	2	–	–	1						
<i>E. acanthopoma</i>	Pacifique	Mâle	2	2	5	–	1							
		Femelle			1									
<i>E. vomerodentata</i>	Indien	Mâle			1									
<i>E. pellegrini</i>	Indien	Femelle	1											
<i>E. cf. pellegrini</i>	Indien	Mâle			1	1*	1							
<i>E. aquadulcis</i>	Pacifique	Femelle	3											
<i>E. sandwicensis</i>	Pacifique	Mâle										1	4	

			Pectoral fin rays (P)			
			15	16	17	18
<i>E. mauritiana</i>	Indien	Mâle	2	9	3	
		Femelle	1	1	1	
<i>E. acanthopoma</i>	Pacifique	Mâle	1	9		
		Femelle		1		
<i>E. vomerodentata</i>	Indien	Mâle	1			
<i>E. pellegrini</i>	Indien	Femelle	1			
<i>E. cf. pellegrini</i>	Indien	Mâle	3*			
<i>E. aquadulcis</i>	Pacifique	Femelle		3		
<i>E. sandwicensis</i>	Pacifique	Mâle			3	2

			Anal fin rays (A)		
			6	7	8
<i>E. mauritiana</i>	Indien	Mâle			14
		Femelle			3
<i>E. acanthopoma</i>	Pacifique	Mâle			10
		Femelle			1
<i>E. vomerodentata</i>	Indien	Mâle			1
<i>E. pellegrini</i>	Indien	Femelle			1
<i>E. cf. pellegrini</i>	Indien	Mâle		1	2*
<i>E. aquadulcis</i>	Pacifique	Femelle			3
<i>E. sandwicensis</i>	Pacifique	Mâle		1	4

			Caudal fin rays (C)				
			12	13	14	15	16
<i>E. mauritiana</i>	Indien	Mâle				14	
		Femelle				3	
<i>E. acanthopoma</i>	Pacifique	Mâle				10	
		Femelle				1	
<i>E. vomerodentata</i>	Indien	Mâle				1	
<i>E. pellegrini</i>	Indien	Femelle				1	
<i>E. cf. pellegrini</i>	Indien	Mâle				3*	
<i>E. aquadulcis</i>	Pacifique	Femelle				3	
<i>E. sandwicensis</i>	Pacifique	Mâle				5	

Tableau 16 : Evaluation du nombre de rayons constituant les nageoires pectorales (P), anale (A) et caudale (C) pour tous les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4 ». Le spécimen n° 13970 est marqué par un astérisque *.

e. Combinaison « ouvert ; 2 »

Deux espèces d'*Eleotris* présentent cette combinaison, *E. oxycephala* et *E. balia*. Concernant cette dernière, son statut de synonyme d'*E. oxycephala* est à confirmer.

Les radiographies (Annexe 1) effectuées sur *E. oxycephala* et *E. balia*, nous indiquent que ces espèces possèdent **24 vertèbres**.

Certains critères morpho-méristiques mesurés sur les types, qui sont des mâles, permettent de distinguer ces deux espèces (Tableaux 17, 18 et 19). En effet, les pourcentages de SDL, AL et CL sont significativement différents : %SDL = 40 vs. 26, %AL = 37 vs. 25, %CL = 29 vs. 18, pour respectivement *E. oxycephala* et *E. balia* et, le nombre de rayons aux nageoires pectorales sont aussi différents (P = 18 vs. 15). Ces deux taxons semblent donc différents. La synonymie d'*E. balia* pour *E. oxycephala* est donc probablement erronée, pour nous ces deux espèces sont valides. L'apport de la génétique, dans un prochain chapitre complétera nos données.

Tableau 17 : Données morpho-métriques pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4 ». Les longueurs sont exprimées en fonction de la longueur standard (en %).

			Second Dorsal Length (%SDL)															
			25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle																1
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle	1															

			Anal fin Length (%AL)												
			25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle												1	
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle	1												

			Caudal Fin Length (%CL)											
			18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle												1
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle	1											

			Jaw Length (%JL)				
			10	11	12	13	14
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle				1	
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle				1	

Tableau 17 : Données morpho-métriques pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4 ». Les longueurs sont exprimées en fonction de la longueur standard (en %). Le nom d'espèce barré signifie que la mesure n'a pu être effectuée.

			Caudal Peduncle depth (%CPD)							
			10	11	12	13	14	15	16	17
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle						1		
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle		1						

			Body Depth at second dorsal fin origin in males (%BDM)												
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle													
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle	1												

			Head Length (%HL)						
			31	32	33	34	35	36	37
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle	1						
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle		1					

			Predorsal Length (%PDL)					
			41	42	43	44	45	46
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle					1	
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle		1				

			Preanal Length (%PAL)							
			61	62	63	64	65	66	67	68
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle			1					
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle					1			

Tableau 19 : Evaluation du nombre de rayons constituant les nageoires pectorales (P), anale (A) et caudale (C) pour tous les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4 ».

			Pectoral fin rays (P)			
			15	16	17	18
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle				1
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle		1		

			Anal fin rays (A)		
			6	7	8
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle			1
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle			1

			Caudal fin rays (C)			
			13	14	15	16
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle			1	
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle			1	

Tableau 18 : Evaluation du nombre d'écailles pour les spécimens présentant une combinaison « fermé ; 2.4 ».

			Lateral series (Lse)									
			44	45	46	47	48	49	50	51	52	53
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle	1									
<i>Eleotris balia</i>	Pacifique	Mâle	1									

			Predorsal midline series (PD)							
			42	43	44	45	46	47	48	
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle							1	
<i>Eleotris balia</i>	Pacifique	Mâle							1	

			Transverse backward series (TRB)							
			13	14	15	16	17	18	19	20
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle	1							
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle				1				

			Transverse forward series (TRF)												
			17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle	1												
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle	1												

			Zigzag series (ZZ)		
			9	10	11
<i>E. oxycephala</i>	Pacifique	Mâle	1		
<i>E. balia</i>	Pacifique	Mâle	1		

V. Nouvelle liste des espèces valides du genre *Eleotris* de l'Indo-Pacifique

A partir de l'observation des types accessibles et des spécimens que nous avons échantillonnés durant nos missions au sein de l'Indo-Pacifique, nous avons pu mettre en place une première **clé d'identification des *Eleotris*** de cette région. Et ce, grâce à une étude morphométrique basée sur de nombreux critères tels que les patterns de papilles sensorielles céphaliques, le nombre d'écailles etc. Cette clé d'identification nous a permis de mettre à jour les différents statuts des noms d'espèces d'*Eleotris* répertoriés dans la littérature et, ainsi, de régler la confusion qui régnait dans cette liste. La **clé des espèces valides** est donnée dans l'encadré ci-après.

Clé de détermination des *Eleotris* de l'Indo-Pacifique

- 1a** – Les rangées longitudinales de papilles sensorielles céphaliques *os* et *oi* se rejoignent près du bord supérieur de l'opercule (Fig. 1a)**2**
- 1b** – Les rangées longitudinales de papilles sensorielles céphaliques *os* et *oi* ne se rejoignent pas près du bord supérieur de l'opercule (Fig.1b).....**3**

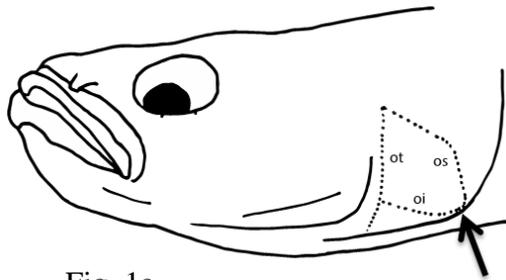


Fig. 1a

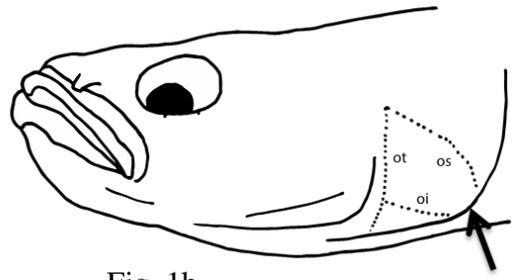


Fig. 1b

- 2a** – Les rangées de papilles sensorielles céphaliques infraoculaires 2, 4 et 6 dépassent la ligne horizontale d (Fig. 2a).....**4**
- 2b** – Les rangées de papilles sensorielles céphaliques infraoculaires 2, 3 et 4 dépassent la ligne horizontale d (Fig. 2b).....**5**
- 2c** – Les rangées de papilles sensorielles céphaliques infraoculaires 2, 4, 5 et 6 dépassent la ligne horizontale d (Fig. 2c).....***E. eigenmanni***.

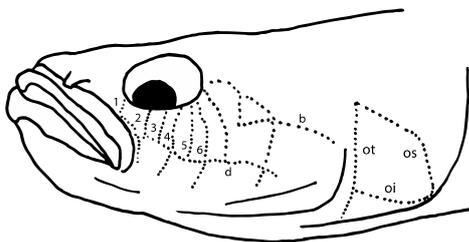


Fig. 2a

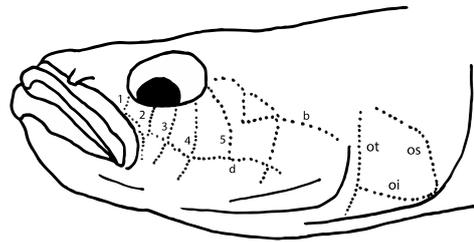


Fig. 2b

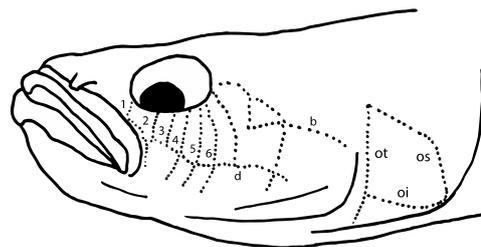


Fig. 2c

- 3a** – La rangée de papilles sensorielles céphaliques infraoculaires 2 dépasse la ligne horizontale d (Fig.3a).....**6**
- 3b** – Les rangées de papilles sensorielles céphaliques infraoculaires 2 et 4 dépassent la ligne horizontale d (Fig. 3b).....**7**

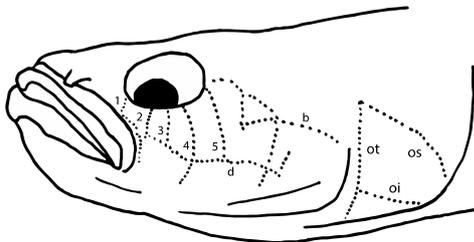


Fig. 3b

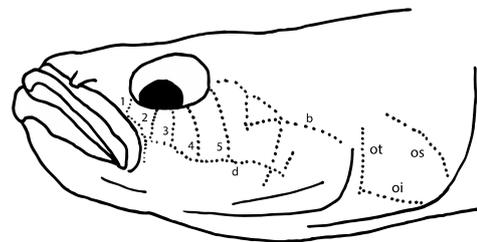


Fig. 3a

- 4a** – Le nombre d’écailles i- sur la ligne latérale est inférieur à 47, ii- sur la série transverse postérieure est inférieure ou égal à 13, iii- sur la série zigzag est inférieur à 12 et iv- le nombre de rayons sur les nageoires pectorales est compris entre 16 et 17 ***E. bosetoi.***
- 4b** – Le nombre d’écailles i- sur la ligne latérale est supérieur à 52, ii- sur la série transverse postérieure est supérieure ou égal à 13, iii- sur la série zigzag est supérieur ou égale à 12 et iv- le nombre de rayons sur les nageoires pectorales est de 18.....***E. fusca.***
- 5a** – Le nombre de rayons sur les nageoires pectorales est de 19 ***E. cf. melanosoma sp3.***
- 5b** – Le nombre de rayons sur les nageoires est compris entre 15 et 18**8**
- 6a*** – Les mesures de %SDL, %AL, et %CL sont respectivement en fonction de la LS de 40%, 37% et 29%. Et le nombre de rayons sur les nageoires pectorales est de 18.....***E. oxycephala.***
- 6b*** – Les mesures de %SDL, %AL, et %CL sont respectivement en fonction de la LS de 26%, 25% et 18%. Et le nombre de rayons sur les nageoires pectorales est de 15...***E. balia.***
- 7a** – Le nombre d’écailles i- sur la ligne latérale est compris entre 45 et 60, ii- sur la série transverse postérieure est compris entre 14 et 19, iii- sur la série zigzag est compris entre 10 et 16 **9**

- 7b** – Le nombre d’écailles i- sur la ligne latérale est compris entre 37 et 38, ii- sur la série transverse postérieure est de 12, iii- sur la série zigzag est de 9 *E. aquadulcis*.
- 7c** – Le nombre d’écailles i- sur la ligne latérale est compris entre 75 et 82, ii- sur la zone prédorsale est compris entre 59 et 75, iii- sur la série transverse postérieure est compris entre 21 et 25, iv- sur la série zigzag est compris entre 19 et 20 *E. sandwicensis*.
- 8a** – Les mesures de %SDL, %AL, %BDM, %JL et de %PDL sont respectivement en fonction de la LS de 24-29%, 23-26%, 16-21%, 10-12% et 42-46%..... *E. cf. melanosoma sp2* – Océan Indien.
- 8b** – Les mesures de %SDL, %AL, %BDM, %JL et %PDL sont respectivement de 28-37%, 27-36%, 20-28%, 12-14% et 46-47%..... *E. melanosoma* – Océan Pacifique.
- 9a*** – Présence de dents sur le vomer. Le nombre d’écailles sur la zone prédorsale est de 41 *E. vomerodentata*.
- 9b** – Absence de dents sur le vomer. Le nombre d’écailles sur la zone prédorsale est compris entre 37-42 *E. acanthopoma*.
- 9c** – Absence de dents sur le vomer. Le nombre d’écailles sur la zone prédorsale est compris entre 30-37..... **10**.
- 10a*** – Les mesures de %SDL et %AL sont respectivement en fonction de la LS de 33% et 31%. Le nombre d’écailles sur la série transverse postérieure est de 16..... *E. pellegrini*.
- 10b**– Les mesures de %SDL et %AL sont respectivement en fonction de la LS de 37-40% et 34-38%. Le nombre d’écailles sur la série transverse postérieure est compris entre 14 et 15..... *E. cf. pellegrini*.

Légende : * mesures effectuées sur le type unique.

Une nouvelle liste d'espèce a donc été mise en place à partir de cette étude morphométrique. Nous dénombrons un total de **14 espèces valides**. Au sein de cette nouvelle liste, les noms d'espèces d'*Eleotris* sont regroupés en fonction de la combinaison de papilles sensorielles céphaliques et classés en fonction de leur date de publication (Tableau 20).

La nouvelle espèce *Eleotris* n. sp. découverte aux îles Salomon a fait l'objet d'une publication « *Eleotris bosetoi* (Teleostei: Gobioidae: Eleotridae), a new species of freshwater fish from the Solomon Islands » en 2016. Cet article sera présenté dans le chapitre suivant (Chapitre 3).

Enfin, certains résultats nécessitent d'être confirmés dans le cadre de notre démarche de taxonomie intégrative. Ainsi, afin de compléter notre étude taxonomique, tous les individus dont il a été possible de séquencer l'ADN ont été utilisés pour réaliser une phylogénie (dans un premier temps, à partir du séquençage du gène *COI*). C'est cette phylogénie que vous nous proposons d'étudier dans le chapitre 4.

Tableau 20 : Nouvelle liste des espèces valides d'*Eleotris* de l'Indo-Pacifique. Les noms d'espèces sont regroupés en fonction des combinaisons de patterns de papilles sensorielles (code couleurs des Fig. 3 et 11) et classés par date de publication. Les noms valides sont surlignés en **jaune** et les modifications de statut par rapport à la première liste effectuée à partir de Eschmeyer (CAS) – Kottelat (2013) sont mises en **gras**. Le symbole **x** signifie que l'absence de type n'a pas permis de statuer sur le nom de l'espèce.

Nom valide	Auteur(s)	Localité type	Statut(s) Eschmeyer-Kottelat	Type(s)	Statut de l'espèce
<i>Eleotris fusca</i>	Bloch & Schneider, 1801	Raiatea, French Polynesia	espèce	Type à définir ?	espèce valide
<i>Poecilia fusca</i>	Bloch & Schneider, 1801	Polynésie Française	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Pas de type	x
<i>Cheilodipterus culius</i>	Hamilton, 1822	India, Bengal	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Pas de type	x
<i>Eleotris niger</i>	Quoy & Gaimard, 1824	Indonesia, Waigeo	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Syntype	synonyme d' <i>E. fusca</i>
<i>Eleotris brachyurus</i>	Bleeker, 1849	Southern Java, Patjitan	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Syntypes	x
<i>Eleotris formasini</i>	Bianconi, 1857	Mozambique	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Holotype	synonyme d' <i>E. fusca</i>
<i>Eleotris incerta</i>	Blyth, 1860	India (OI)	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Pas de type	x
<i>Eleotris cavifrons</i>	Blyth, 1860	Andaman Island (OI)	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Pas de type	x
<i>Eleotris vitianus</i>	Sauvage, 1880	Fiji Islands	?	Syntypes	synonyme d' <i>E. fusca</i>
<i>Eleotris klunzingerii</i>	Pfeffer, 1893	Zanzibar	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Holotype (photos)	synonyme d' <i>E. fusca</i>
<i>Eleotris andamanensis</i>	Herre, 1939	Andaman Island	espèce	Paratypes	synonyme d'<i>E. fusca</i>
<i>Eleotris bosetoi</i>	Memmeson et al., 2016	Solomon Island	–	Holotype	espèce valide
<i>Eleotris melanura</i>	Bleeker, 1849	Southern Java, Pasuruan	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Type ?	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Eleotris melanosoma</i>	Bleeker, 1853	Western Sumatra, Wahai	espèce	Syntypes	espèce valide
<i>Eleotris pseudacanthopomus</i>	Bleeker, 1853	Western Sumatra	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Holotype	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Culius macrocephalus</i>	Bleeker, 1857	Indonesia - Buru	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>	Holotype	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Eleotris soaresi</i>	Playfair, 1867	Mozambique	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Syntypes	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Culius insulindicus</i>	Bleeker, 1875	Indonesia - Sumatra	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>	Syntypes	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Culius macrolepis</i>	Bleeker, 1875	Indonesia - Ambon	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>	Syntypes	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Eleotris fortis</i>	Tanaka, 1912	Taiwan	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>	Type perdu	x
<i>Eleotris hainanensis</i>	Chen, 1933	China	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>	Pas de type	x
<i>E. cf. melanosoma</i> sp2	–	Mayotte	–	–	espèce valide
<i>E. cf. melanosoma</i> sp3	–	Bali	–	–	espèce valide
<i>Eleotris eigenmanni</i>	Popta, 1921	Indonesia	synonyme d' <i>E. fusca</i>	Lecto et Paralectotypes	espèce valide

Tableau 20 (suite) : Nouvelle liste des espèces valides d'*Eleotris* de l'Indo-Pacifique. Les noms d'espèces sont regroupés en fonction des combinaisons de patterns de papilles sensorielles (code couleurs des Fig. 3 et 11) et classés par date de publication. Les noms valides sont surlignés en **jaune** et les modifications de statut par rapport à la première liste effectuée à partir de Eschmeyer (CAS) – Kottelat (2013) sont mises en **gras**. Le symbole **x** signifie que l'absence de type n'a pas permis de statuer sur le nom de l'espèce.

Nom valide	Auteur(s)	Localité type	Statut(s) Eschmeyer-Kottelat	Type(s)	Statut de l'espèce
<i>Eleotris acanthopoma</i>	Bleeker, 1853	Sumatra	espèce	Holotype	espèce valide
<i>Eleotris mauritiana</i>	Bennett, 1832	West Indian Ocean	espèce	Holotype ?	synonyme d' <i>E. acanthopoma</i>
<i>Eleotris sandwicensis</i>	Vaillant & Sauvage, 1875	Hawaiian Islands	espèce	Syntypes	espèce valide
<i>Eleotris aquaducis</i>	Allen & Coates, 1990	Papua	espèce	Paratypes	espèce valide
<i>Eleotris pellegrini</i>	Maugé, 1984	Madagascar	espèce	Syntypes	espèce valide
<i>Eleotris vomerodentata</i>	Maugé, 1984	Madagascar	espèce	Holotype	espèce valide
<i>E. cf. pellegrini</i>	–	Madagascar & Seychelles	–	–	espèce valide ?
<i>Eleotris oxycephala</i>	Temminck & Schlegel, 1845	Japon	espèce	Possible syntype	espèce valide
<i>Eleotris cantherius</i>	Richardson, 1846	China	syno. d' <i>E. oxycephala</i>	Pas de type	x
<i>Eleotris balia</i>	Jordan & Seale, 1905	Japon & Chine	espèce & syno. <i>E. oxycephala</i>	Holotype	espèce valide
<i>Eleotris lutea</i>	Day, 1876	Andaman Island	espèce	Syntypes	x
<i>Eleotris pallida</i>	Castelnau, 1875	Australia	?	Pas de type	x
<i>Eleotris fasciatus</i>	Chen, 1964	Taiwan	espèce	Pas de type	x

Description d'une espèce d'*Eleotris* endémique des îles Salomon : *E. bosetoi*

***Eleotris bosetoi* (Teleostei: Gobioidi: Eleotridae), une nouvelle espèce de poisson
d'eau douce des îles Salomon**

Article publié dans Pacific Science - in press

Résumé – Une nouvelle espèce d'*Eleotris* a été découverte dans les rivières des îles Salomon à partir d'une analyse génétique basée sur le gène mitochondrial *COI* et d'une étude morphométrique. Cette nouvelle espèce se distingue d'*E. acanthopoma*, d'*E. melanosoma* et d'*E. fusca* par respectivement des pourcentages de divergences de 14%, 11% et 9,9%. Cette espèce partage avec son espèce sœur, *E. fusca*, la même combinaison de papilles sensorielles céphaliques (2.4.6 pattern) *i.e.*, la seconde, la quatrième et la sixième ligne suborbitale libre de neuromastes sur la joue croisent et dépassent la ligne horizontale d et les lignes os et oi se rejoignent sur l'opercule. Cependant, ces deux espèces sœurs diffèrent dans leurs nombres d'écailles sur la ligne latérale 42-46 *vs.* 53-67, sur la série transverse postérieure 11-13 *vs.* 13-21 et, la série zigzag 9-11 *vs.* 12-17.

***Eleotris bosetoi* (Teleostei: Gobioidae: Eleotridae), a New Species of freshwater fish
from the Solomon Islands**

Article published in Pacific Science – in press

Abstract – A new species of *Eleotris*, a freshwater Eleotrid, is described from streams of the Solomon Islands using both genetic analysis based on the mitochondrial *COI* gene and morpho-meristic study. The new species is separated from *E. acanthopoma*, *E. melanosoma* and *E. fusca* with a mean pairwise divergence of 14%, 11% and 9.9% respectively. It shares with *E. fusca*, its sister species, the same combination of cephalic free neuromast patterns *i.e.* second, fourth and sixth suborbital free neuromast rows on cheek extending ventrally past horizontal row d (2.4.6 pattern) and row os connecting with row oi at ventro-posterior margin of opercle, but it differs by a combination of characters including scales in lateral series 42-46 *vs.* 53-67, transverse back series 11-13 *vs.* 13-21 and zigzag series 9-11 *vs.* 12-17.

Keywords: Amphidromous, *Eleotris*, Solomon Islands, morpho-meristic

Running title: A new species of *Eleotris*

Introduction

There have been limited collections of freshwater organisms in the Solomon Islands. The earliest mention of ichthyofaunal surveys in the Solomon Islands is Macleay (1879) followed by Herre (1931) but their primary taxonomic emphasis was on marine ichthyofauna. Since that time there has been sporadic mention of freshwater fishes in the Solomon Islands and mostly in the form of taxonomic literature. Gray (1974) published a brief account including 36, mainly brackish, fish species. In the past decade, a few surveys for freshwater fishes have been conducted in the Solomon Islands by Boseto et al. (2007), Jenkins & Boseto (2007), Polhemus et al. (2008), Boseto & Sirikolo (2010) and Boseto et al. (2010). Clearly there is scope for more comprehensive collections.

As part of a CEPF (Critical Ecosystem Partnership Fund) project held by the French ichthyological Society, two field trips were organised on Choiseul Island, at a high-priority site, the Kolombongara watershed, including the Sirebe Rainforest and Biodiversity Conservation Area (SRBCA) and Vuri Rainforest and Biodiversity Conservation Area (VRBCA), during 3 weeks in October 2014 and November 2015, and on Kolombangara Island in November 2015. During these surveys *Eleotris* specimens were collected and first identified with the determination key specialised in Indo-Pacific insular freshwater fishes (Keith et al. 2010 & 2013). Three common known species of the Pacific Ocean were caught: *Eleotris fusca* (Schneider & Forster, 1801), *E. acanthopoma* (Bleeker, 1853) and *E. melanosoma* (Bleeker, 1852); and an unknown species. Indeed, we noticed that some specimens with the cephalic free neuromast pattern of *E. fusca* presented a particular morphology. According to these observations, we studied the *Eleotris* species found using morpho-meristic and genetic analysis based on the mitochondrial *COI* gene. The purpose of this paper is to provide a description of the new species.

Table 1. Details of tissue samples of *Eleotris* specimens used in the study.

Countries	Islands	<i>E. n. sp.</i>	<i>E. fusca</i>	<i>E. acanthopoma</i>	<i>E. melanosoma</i>
Society Islands	Moorea		MNHN 2016-0024 (1)	MNHN 2016-0025 (1)	MNHN 2016-0029 (1)
Cook Islands	Rarotonga			MNHN 2016-0026 (1)	
Vanuatu	Maewo			MNHN 2016-0027 (1)	
–	Epi		MNHN 2015-0378 (1)		
New Caledonia	Grande Terre		MNHN 2015-0383 (1)		
Samoa	Upolu		MNHN 2015-0364 (1)		
Salomon	Choiseul	MNHN 2015-0380 (1) MNHN 2015-0379 (1) MNHN 2015-0381 (1)	MNHN 2015-0370 (1)		
–	Kolobangara	MNHN 2015-0382 (1) MNHN 2016-0001(1) MNHN 2015-0002 (1) MNHN 2016-0003 (1)		MNHN 2016-0028 (3)	MNHN 2016-0030 (1) MNHN 2016-0031 (1) MNHN 2016-0032 (1) MNHN 2016-0033 (1)
Indonesia	Papua		MNHN 2015-0377 (1)		
Caroline Islands	Palau		MNHN 2015-0368 (1)		
Micronesia	Pohnpei		MNHN 2015-0369 (1)		
	Total	N=7	N=8	N=6	N=5

I. Materials & methods

1. Material

During these three field trips, 142 *Eleotris* were sampled in Solomon Island rivers using a DEKA 3000 electrofishing system (Gerätebau, Marsberg, Germany): 119 *E. fusca*, 8 *E. acanthopoma*, 4 *E. melanosoma*, and 11 belonged to the new species. The data from Solomon Islands were compared with other *Eleotris* specimens caught in the rivers of other Pacific Ocean islands, including type specimens, and deposited in museum collections (see comparative material).

2. DNA analyses

A total of 26 *Eleotris* tissue samples collected in the Pacific Ocean (Solomon Islands, Polynesia [Moorea, Rarotonga], Philippines, Vanuatu, Palau, Papua, Micronesia, Samoa and New Caledonia) and held in the Muséum national d'Histoire Naturelle (MNHN) (Table 1) were used for genetic analyses. For DNA extraction we used Macherey & Nagel NucleoSpin® Tissue kits following the manufacturer's instructions on an Eppendorf EpMotion 5075. A mitochondrial fragment of the *COI* gene (585 pb) was amplified using the specific fish primers TeIF1 5'TCGACTAATCAYAAAGAYATYGGCAC3' and TeIR1 5'ACTTCTGGGTGNCCAAARAATCARAA3' (Dettai et al. 2011). DNA amplification was performed by PCR in a final 20 µL volume containing 5% DMSO, 1 µL of dNTP 6.6 µM, 0.15 µL of Qiagen Taq DNA polymerase, using 2 µL of the buffer provided by the manufacturer, and 0.4 µL of each of the two primers at 10 pM; 1.2 µL of DNA extract was added. After denaturation for 2 min at 94°C, the PCR was run for 55 cycles of (25s, 94°C; 25s, 54°C; 55s, 72°C) on a Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler. Successful PCRs were selected on ethidium-bromide stained agarose gels. Sanger sequencing was performed in both directions by a commercial company (Eurofins; <http://www.eurofins.fr>) using the same primers. For the outgroup, we included a sequence of *Hypseleotris agilis* (JN021219) from GenBank.

Data processing and sequence assembly were done in Geneious 9.0.5. All the *COI* sequences were aligned with Muscle Alignment. The phylogenetic analysis was performed using Bayesian inference (MrBayes 3.2; Ronquist et al. 2012) with the model HKY + G computed by jModelTest 2.1.1 (Guindon & Gascuel, 2003; Darriba et al., 2012). Four

independent analyses were run for 10 million generations, sampling every 200 generations. Ten percent of the trees were discarded as burn-in, after having checked that it was sufficient for convergence. After checking convergence had been reached, the trees and parameters resulting from the four analyses were pooled and combined in a consensus. Intra- en inter- specific distances (p -distances) were obtained with the Muscle algorithm in Geneious.

3. Morpho-meristic

Methods follow Keith et al. (2012). Measurements of specimens were taken with a dial calliper to the nearest tenth of a millimeter. All counts were taken from the right side. The size is given as standard length (SL). Abbreviations for institutions and collections cited follow <http://www.asih.org/resources/standard-symbolic-codes-institutional-resource-collections-herpetology-ichthyology>.

Scale and fin ray counts are reported as: A, anal fin elements (includes flexible spine and segmented rays); D, dorsal fins (D1, first dorsal fin spines; D2, second dorsal fin elements); P, pectoral fin rays; C, caudal fin rays (only branched rays are reported); LS, scales in lateral series counted from upper pectoral fin base, or anteriormost scale along lateral midline, to central hypural base; PD, predorsal midline scales counted from scale directly anterior to first dorsal fin insertion to the anteriormost scale; TRB, transverse series backward, refers to scales counted from the first scale anterior to second dorsal fin origin, in a diagonal manner, posteriorly and ventrally to the anal fin base or ventralmost scale; TRF, transverse series forward, refers to scales counted from the first scale anterior to second dorsal fin origin, in a diagonal manner, anteriorly and ventrally to the centre of abdomen or ventralmost scale; ZZ, zigzag series, refers to scales on the narrowest region of the caudal peduncle counted from the dorsalmost scale to the ventralmost scale in a zigzag (alternating) manner.

Eleotris species are mainly distinguished by the superficial neuromast patterns of the head (Akihito 1967). Cephalic neuromast distribution patterns and urogenital papilla anatomy were examined and illustrated with the aid of a dissecting microscope and camera lucida. Cephalic neuromast patterns are described using terminology developed by Sanzo (1911) with modifications employed by Miller and Wongrat (1991) and Pezold and Cage (2001). Transverse opercular rows are labelled ot. Upper and lower longitudinal rows on the operculum are labeled

os and oi, respectively. Transverse suborbital rows are designated with Arabic numbers and major horizontal rows on the cheek are indicated with the letters b and d.

To simplify references to the particular transverse suborbital rows crossing row d, a formula of row numbers separated by periods is used (see Pezold and Cage 2001). For example, if rows 2, 4 and 6 cross row d, this condition is represented by the formula '2.4.6'.

The main cephalic neuromast pattern of the three most common *Eleotris* in Pacific Ocean are presented with schematic drawings in Figure 1. For this figure, we used a syntype of *E. melanosoma* (RMNH 4815), the holotype of *E. acanthopoma* (RMNH 25934) and for *E. fusca* there is no type known, consequently we used a syntype of *E. niger* (MNHN A-1578) which is a synonym of *E. fusca*.

II. Results & discussion

1. Genetic results

The phylogenetic tree-based on the *COI* gene (585 bp), among the *Eleotris* sampled in rivers of Pacific Ocean islands, supported species-level differentiation (Fig. 2). The clade A with *E. acanthopoma* is separated, with a 14% mean pairwise divergence, from the clade B that included the three congeneric species, *E. melanosoma* (B₁), *E. n. sp.* (B₂) and *E. fusca* (B₃). *E. melanosoma* (B₁) is separated with an 11% mean pairwise divergence from *E. n. sp.* and *E. fusca* (B₂ & B₃) and these two last sister species are separated from each other by a mean pairwise divergence of 9.9%.

The genetic analysis revealed a distinct species from *E. fusca*, *E. acanthopoma* and *E. melanosoma*. This species is described thereafter.

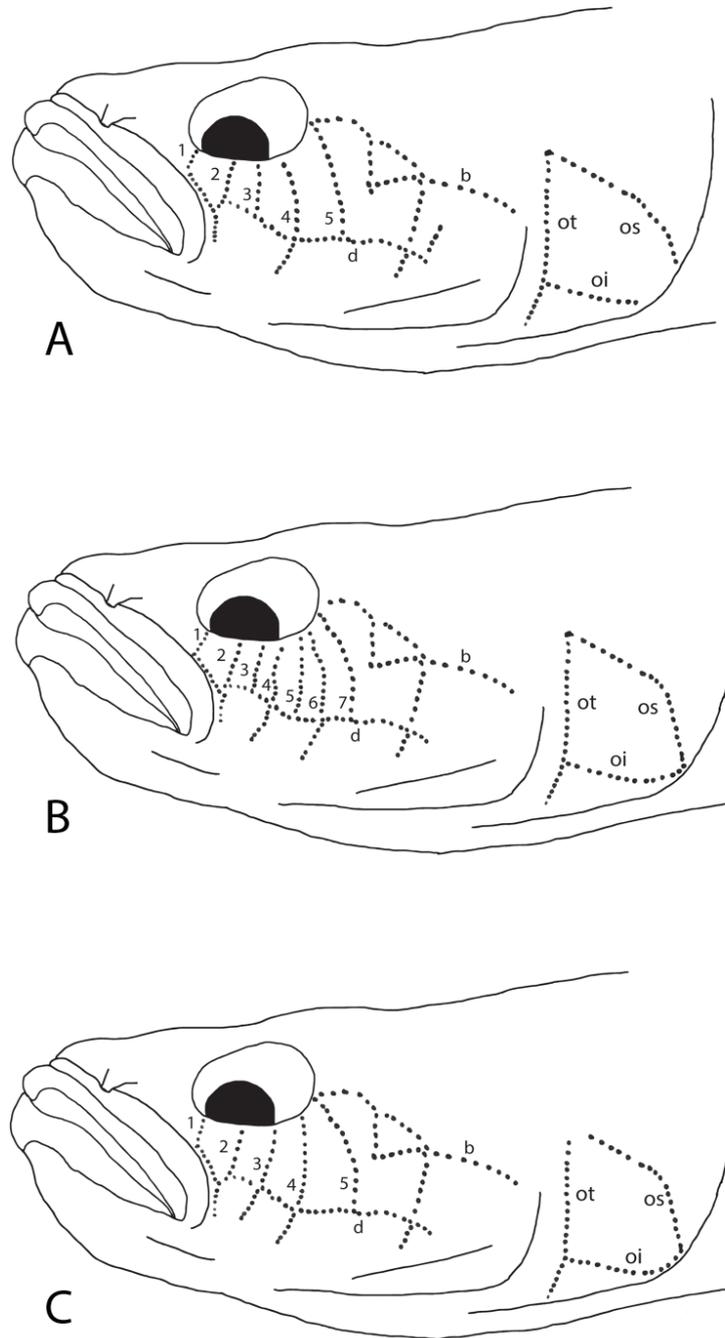


Figure 1. Schematic illustrations showing main cephalic free neuromast pattern of A- *Eleotris acanthopoma* (Holotype – RMNH 25934), B- *Eleotris niger* (Syntype – MNHN A.1578) synonym of *E. fusca* and *Eleotris bosetoi* (n. sp.) (Holotype – MNHN 2015-0382) and C- *Eleotris melanosoma* (Syntype – RMNH 4815).

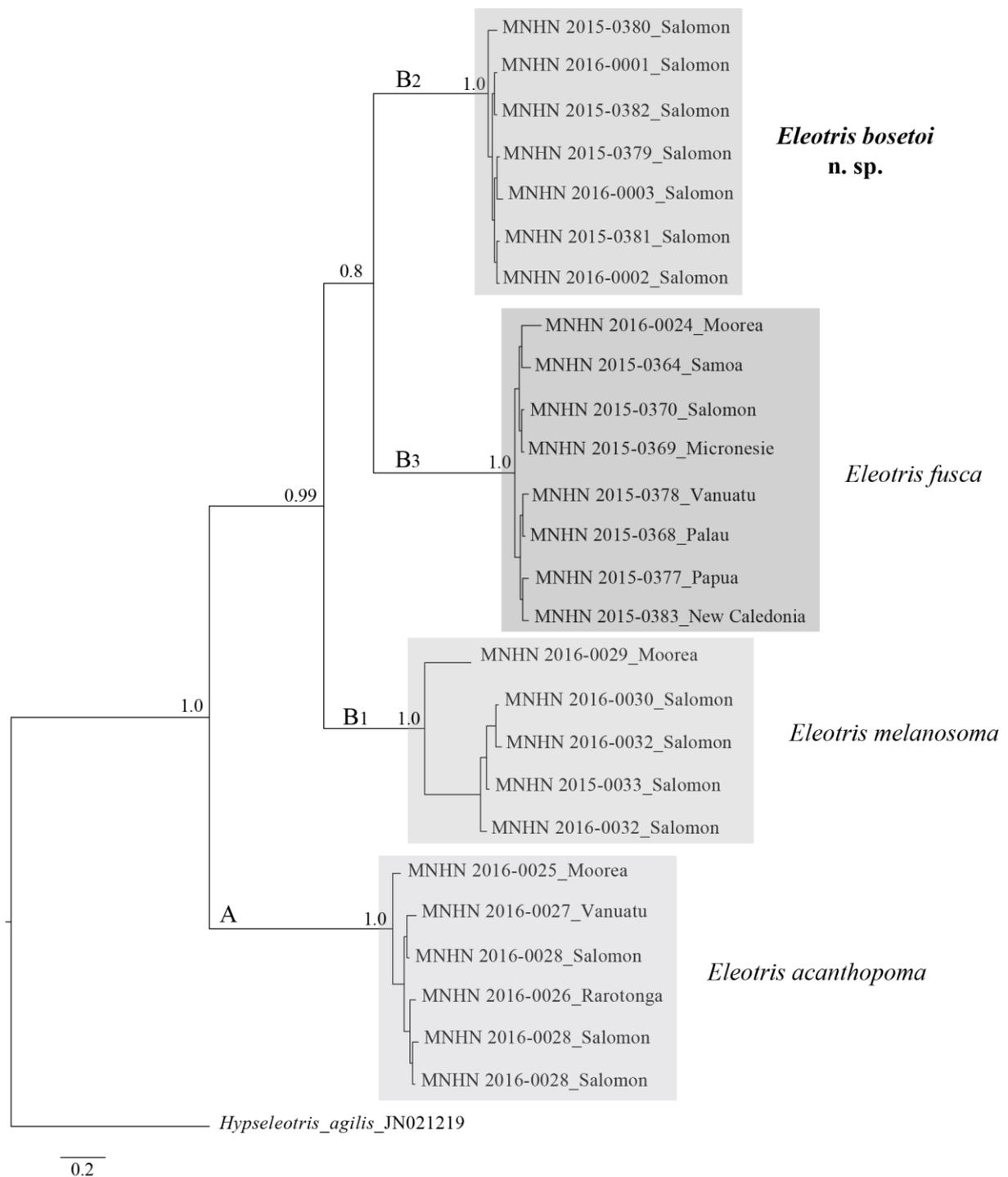


Figure 2. Bayesian tree of the cytochrome c oxidase subunit (COI) for sequenced specimens of *Eleotris*. Numbers on the nodes represent posterior probabilities. The four *Eleotris* species are highlighted with boxes.

2. Description of the new species

As the sister species of *Eleotris* n. sp. is *E. fusca*, both sharing the same cephalic neuromast pattern, they are compared in the text and tables.

Eleotris bosetoi, n. sp. Figures 1-4, Tables 2-3

3. Material examined

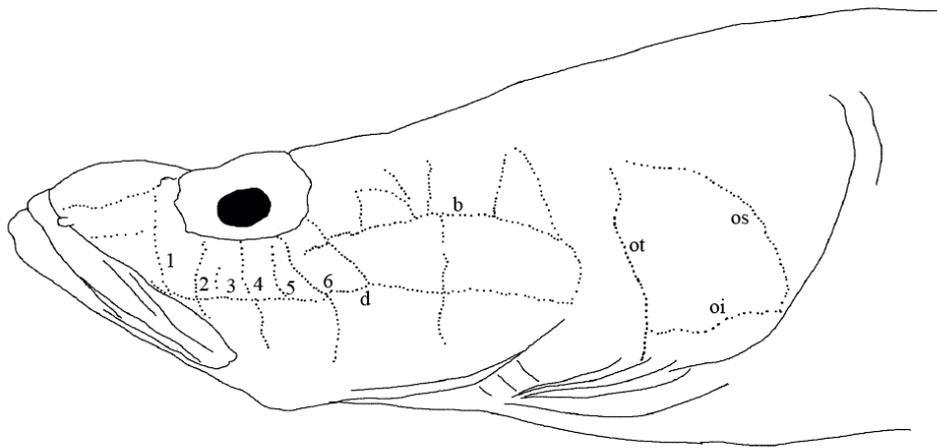
Four males and three females collected from Choiseul and Kolobangara islands (Solomon Islands) with a size range of 15.3-101.6 mm SL.

Holotype. - MNHN 2015-0382, female (101.6 mm SL), Zamba River, Kolobangara Island, Solomon Islands; 10 Nov. 2015; Keith, Lord, Boseto and Marquet coll.; tag 13558.

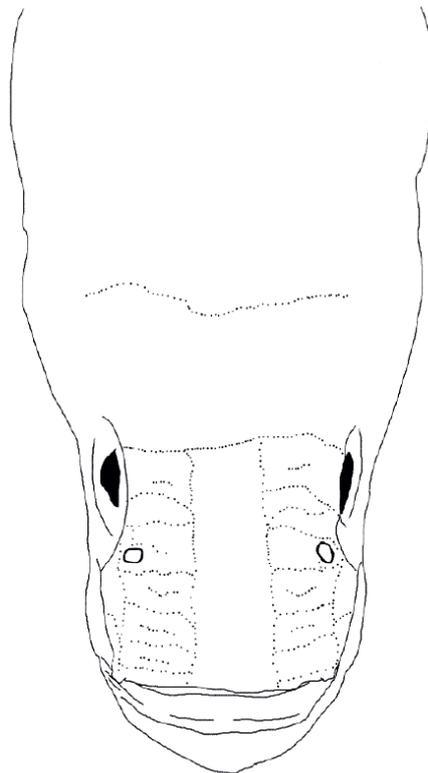
Paratypes. - MNHN 2015-0380, female (70 mm SL), Lokasereke River, Choiseul Island, Solomon Islands; 13 Oct. 2014; Keith, Marquet, Gerbeaux, Boseto and Ebner coll.; tag 13529. MNHN 2015-0379, female (77.6 mm SL), Pisuku River, Choiseul Island, Solomon Islands; 10 Oct. 2014; Keith, Marquet, Gerbeaux, Boseto and Ebner coll.; tag 13528. MNHN 2015-0381, male (24 mm SL), Pisuku River, Choiseul Island, Solomon Islands; 12 Oct. 2014; Keith, Marquet, Gerbeaux, Boseto and Ebner coll.; tag L-214. MNHN 2016-0001, male (49.4 mm SL), Vanga River, Kolobangara Island, Solomon Islands; 18 Nov. 2015; Keith, Lord, Boseto and Marquet coll.; tag 12491. MNHN 2016-0002, male (23.5 mm SL) same data as holotype; tag L-269. MNHN 2016-0003, juvenile (15.3 mm SL), Liva River, Kolobangara Island, Solomon Islands; 11 Nov. 2015; Keith, Lord, Boseto and Marquet coll.; tag L-230.

4. Diagnosis

The new species is distinguished by second, fourth and sixth suborbital free neuromast rows on cheek extending ventrally past horizontal row d (2.4.6 pattern); row os connecting with row oi at ventro-posterior margin of opercle (Fig. 3); scales in lateral series 43-46, in zigzag series 9-11 and 12-13 in transverse back series (Table 2).



A



B

Figure 3. Cephalic free neuromast pattern of *Eleotris bosetoi* n. sp. (MNHN 2015-0380) in lateral (A) and dorsal views (B).

Table 2. Scale counts in *Eleotris bosetoi* n. sp. and *E. fusca*.

		Lateral series																									
		42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
<i>Eleotris fusca</i>	male											1	-	1	3	2	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2
<i>Eleotris fusca</i>	female											1	-	-	-	-	-	1	2	-	2	1	2				
<i>Eleotris bosetoi</i>	male	1	1	1	-	1																					
<i>Eleotris bosetoi</i>	female				1	2																					

		Predorsal series																									
		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
<i>Eleotris fusca</i>	male						1	-	-	1	-	-	2	1	-	1	-	-	-	1							
<i>Eleotris fusca</i>	female		1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Eleotris bosetoi</i>	male	1	1	1																							
<i>Eleotris bosetoi</i>	female								1	-	-	1	-	-	-	-	1										

		Transverse back series											
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<i>Eleotris fusca</i>	male					3	2	5	2				
<i>Eleotris fusca</i>	female			1	-	-	-	3	-	3	1	1	
<i>Eleotris bosetoi</i>	male	1	2	1									
<i>Eleotris bosetoi</i>	female		2	1									

		Transverse forward series												
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
<i>Eleotris fusca</i>	male	1	2	-	1	-	1	2	-	2	1			
<i>Eleotris fusca</i>	female	1	-	1	1	2	-	-	1	-	-	1	1	1
<i>Eleotris bosetoi</i>	male	1	-	-	-	1	-	1	1					
<i>Eleotris bosetoi</i>	female			1	-	1	-	-	-	1				

		Zigzag series								
		9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>Eleotris fusca</i>	male				2	-	3	3	1	1
<i>Eleotris fusca</i>	female				2	-	3	3	1	
<i>Eleotris bosetoi</i>	male	1	3							
<i>Eleotris bosetoi</i>	female	1	-	2						

5. Description

Scale counts in *Eleotris bosetoi* n. sp. and *E. fusca* are given in Table 2, and morphometric in Table 3. Below, the holotype counts are given first followed in brackets, if different, by the paratype counts.

Body low and torpedo like. Head broad and depressed. Dorsal fins VI-I,8; D1 separate from D2 and twice smaller; spines not elongate. D2 rounded; length between 19 and 29% of

the SL. Anal fin I,8, oval, and directly opposite to second dorsal fin. Appressed median fins not reaching caudal-fin base. Pelvic fins separate, I,5, not reaching anus; length between 12 and 24% of the SL. Pectoral fins 16-17, oblong, and longer than pelvic fins, reaching to vertical through urogenital base; length between 20 and 31% of the SL. Caudal fin rounded with 15 branched rays; length between 22 and 32% of the SL.

Table 3. Morphometric values for *Eleotris bosetoi* n. sp. and *E. fusca* expressed to the nearest whole percent of standard length.

		Second Dorsal Length															
		19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
<i>Eleotris fusca</i>	male				1	-	-	1	1	1	-	1	4	1	-	-	1
<i>Eleotris fusca</i>	female		1	1	-	-	1	2	-	2	1	-	1				
<i>Eleotris bosetoi</i>	male	1	-	1	-	2											
<i>Eleotris bosetoi</i>	female							2	-	-	-	1					

		Anal fin Length							
		23	24	25	26	27	28	29	30
<i>Eleotris fusca</i>	male		1	1	1	1	1	4	1
<i>Eleotris fusca</i>	female	1	3	2	1	-	2		
<i>Eleotris bosetoi</i>	male	2	1	1					
<i>Eleotris bosetoi</i>	female	1	-	-	1	-	-	1	

		Caudal fin Length																	
		22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
<i>Eleotris fusca</i>	male			1	-	-	1	-	-	-	2	4	2						
<i>Eleotris fusca</i>	female			-	-	1	1	-	1	1	1	-	1	1	1	-	-	-	1
<i>Eleotris bosetoi</i>	male	1	1	-	-	-	-	1											
<i>Eleotris bosetoi</i>	female									2	-	1							

		Pectoral fin Length											
		20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
<i>Eleotris fusca</i>	male				1	3	1	2					
<i>Eleotris fusca</i>	female				1	2	2	1	-	1	2		
<i>Eleotris bosetoi</i>	male		1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Eleotris bosetoi</i>	female	1	-	-	-	1	-	1					

Table 3. Morphometric values for *Eleotris bosetoi* n. sp. and *E. fusca* expressed to the nearest whole percent of standard length.

		Pelvic fin Length												
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<i>Eleotris fusca</i>	male						1	2	2	3	-	1		
<i>Eleotris fusca</i>	female				1	-	3	1	1	3	1			
<i>Eleotris bosetoi</i>	male	1	-	-	-	1	-	-	1	-	-	1		
<i>Eleotris bosetoi</i>	female							2	-	-	-	-	-	1

		Jaw Length								
		6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Eleotris fusca</i>	male							4	4	2
<i>Eleotris fusca</i>	female	1	-	-	1	2	3	2		
<i>Eleotris bosetoi</i>	male				1	-	3			
<i>Eleotris bosetoi</i>	female						2	1		

		Caudal Peduncle depth						
		11	12	13	14	15	16	17
<i>Eleotris fusca</i>	male	1	1	-	1	4	2	1
<i>Eleotris fusca</i>	female		1	2	5	1		
<i>Eleotris bosetoi</i>	male	1	3	-				
<i>Eleotris bosetoi</i>	female		2	1				

		Body Depth at second dorsal fin origin in males										
		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
<i>Eleotris fusca</i>	male				1	1	-	2	3	1	-	1
<i>Eleotris bosetoi</i>	male	3	-	1								

		Head Length										
		27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
<i>Eleotris fusca</i>	male					1	1	3	4	1		
<i>Eleotris fusca</i>	female					1	2	2	1	1	1	1
<i>Eleotris bosetoi</i>	male	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1
<i>Eleotris bosetoi</i>	female								1	-	1	1

Table 3. Morphometric values for *Eleotris bosetoi* n. sp. and *E. fusca* expressed to the nearest whole percent of standard length.

		Predorsal Length										
		41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
<i>Eleotris fusca</i>	male				1	1	-	5	1	2		
<i>Eleotris fusca</i>	female	1	-	2	1	2	1	-	-	2		
<i>Eleotris bosetoi</i>	male						3	-	-	1		
<i>Eleotris bosetoi</i>	female						2	-	-	-	-	1

		Preanal Length													
		59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
<i>Eleotris fusca</i>	male					1	1	3	2	-	1	-	1	1	1
<i>Eleotris fusca</i>	female			1	-	-	1	2	1	-	-	1	2		
<i>Eleotris bosetoi</i>	male	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1		
<i>Eleotris bosetoi</i>	female									1	2				

A downward pointing spine at the posterior margin of the preoperculum is covered with skin. Gill opening is moderately broad, extending to below the preoperculum. Gill rakers on outer surface of the first arch 2-3+2-3+7-8. Snout pointed. Tubular anterior nares overhanging half upper lip at front of snout; posterior nares open pits, placed behind, near the eye. Eyes high on head. Mouth large and oblique, posterior margin of upper jaw reaches the vertical through the first third of the eye. Upper and lower jaws with multiple (12-14) rows of small blunt teeth; a few caniniform teeth in posterior position. Biggest specimen with a humped profile on the nape.

Cephalic lateralis: Adults with seven transverse suborbital free neuromast rows of which second, fourth and sixth suborbital free neuromast rows on cheek extend ventrally past horizontal row d (2.4.6 pattern); row os connecting with row oi at ventro-posterior margin of opercle and many short supernumerary segments often present between transverse rows (Fig. 3).

Cycloid scales on top of head, nape, cheek, opercle, pectoral-fin base, pre-pelvic region, and abdomen. Ctenoid scales covering flanks. No lateral line canals. 46(42-46) scales in lateral

series, 40(30-45) in predorsal series, 13 (11-13) in transverse back series, 21 (15-21) in transverse forward series and 11 (9-11) in zigzag series.

Urogenital papilla in females rounded and flattened; elongated in males.

6. Colour in life

Male and female similar. Head and body dark brown or black. Abdomen and gular region pale brown to whitish near the cheek. First dorsal fin with 2-3 large dark bands alternating with 3 thin white lines. Second dorsal, anal and pelvic fins with 5-6 brownish wavy spotted rows. Caudal fin dark brown to brown, primarily without spots anteriorly, increasing white speckling posteriorly and with a distal white trailing edge. Pectoral fins predominantly brown with sparse white spotting (Fig. 4).



Figure 4. *Eleotris bosetoi* n. sp., MNHN 2015-0382 (live specimen, in aquarium), female (101.6 mm SL), Zamba river, Kolobangara Island, Solomon; 10 Nov. 2015; P. Keith, C. Lord, D. Boseto and Marquet coll. (photograph: P. Keith).

7. Colour in preservation

Head, preoperculum and body dark-brown or greyish. Abdomen and gular region greyish to yellowish. First dorsal fin with 2-3 large dark bands alternating with 2-3 small white ones. Anal and second dorsal fins with 4-5 brownish wavy spotted rows. Caudal fin black to dark grey, primarily without spots anteriorly, increasing white speckling posteriorly and with a distal white trailing edge. Pectoral fins slightly spotted. Pelvic fins dusky.

8. Comparison

Eleotris bosetoi n. sp. differs from *E. acanthopoma* in cephalic neuromast pattern in having “2.4.6” vs. “2.4”. Opercular row patterns also differ; oi and os are connected for the new species unlike for *E. acanthopoma* (Fig. 1A, 4). The new species have the same opercular row patterns as *E. melanosoma* but they have a different cephalic neuromast pattern “2.4.6” vs. “2.3.4” (Fig. 1C, 4). *E. bosetoi* n. sp. differs from *E. fusca* in having 42-46 scales in lateral series versus 53-67, in zigzag series 9-11 versus 12-17 and in transverse back series 11-13 versus 13-21 (Table 2).

9. Distribution

Currently known only from the Solomon Islands.

10. Ecology

Eleotris bosetoi n. sp. was found in muddy to clear rivers with sandy to gravel bottom between 5 to 15 metres in altitude (this study). It is a carnivorous species that feeds on crustaceans and fishes (seen with X-ray and stomach contents, pers. comm.). It was found in sympatry with *E. fusca* and *E. acanthopoma*.

11. Etymology

The name of the species honours our friend David Boseto for his extensive and enthusiastic work on the freshwater fauna of the Solomon Islands.

12. Comparative material

Eleotris fusca (Bloch & Schneider 1801) - *Eleotris niger* Quoy and Gaimard 1824; MNHN A-1578 syntype, 1 male (89 mm SL); Waigeo, Indonesia. *Eleotris vitianus* Sauvage 1880; MNHN A - 1420 syntypes (2 from 4), 2 males (93.3-118 mm SL); Fiji Islands. MNHN 2015-0364, 1 male, 1 female (78.2-95.4 mm SL), Samoa, Upolu, 25/7/2008, Keith et al. coll; tags 16023, 16024. MNHN 2015-0365, 2 males, 1 female (45.2-58.2 mm SL), Bali, Tukad Unda, Indonesia, 22/4/2014, Keith et al. coll; tags 12443, 12446, 12447. MNHN 2015-0366, 1 female (58.4 mm SL), Ua Uka, Marquesas, 24/2/2009, Pascal et al. coll; tag 16087. MNHN 2015-0367, 1 male (52.8 mm SL), Kumafa, Papua, 15/10/2010, Keith et al. coll; tag 16015. MNHN 2015-0368, 1 male (32.7 mm SL), Tireloach, Palau, 28/2/2011, Keith et al. coll; tag 16017. MNHN 2015-0369, 1 male (32.7 mm SL), Pohnpei, 14/3/2012, Keith et al. coll; tag 16019. MNHN 2015-0370, 1 male (64.8 mm SL), Lokapava, Choiseul, Solomon, 21/10/2014, Keith et al. coll; tag 13531. MNHN 2015-0371, 1 female (33.8 mm SL), Maewo, Vanuatu, 12/11/2007, Keith et al. coll; tag 16124. MNHN 2015-0372, 1 female (47.3 mm SL), Moorea, French Polynesia, 06/2007, Sasal et al. coll; tag 16097. MNHN 2015-0373, 1 female (55.7 mm SL), Rurutu, French Polynesia, 06/2001, Keith et al. coll; tag 16094. MNHN 2015-0374, 1 female (62 mm SL), Tubuai, French Polynesia, 07/2007, Sasal et al. coll; tag 16086. MNHN 2015-0375, 1 male (71 mm SL), Alegre, Philippines, 5/2/2014, Gaulke et al. coll; tag 12450. MNHN 2015-0376, 1 female (42.6 mm SL), Samoa, Upolu, Palilua riv., 24/7/2008, Keith et al. coll; tag 16020. MNHN 2015-0377, 1 male (47 mm SL), Papua, 26/10/2008, Keith et al. coll; tag 16018. MNHN 2015-0378, 1 female (42.6 mm SL), Vanuatu, Epi, Buavinai, 27/11/2014, Mennesson et al. coll; tag 13526. MNHN 2015-0383, juvenile (21.45 mm SL), New Caledonia, Wan Pwé On, 02/02/2013, Taillebois et al. coll; tag L-207. MNHN 2016-0024, 1 male (71,1 mm SL), Moorea, French Polynesia, 07/2007, Sasal et al. coll; tag 11777.

E. melanosoma (Bleeker 1852) - RMNH 4815 syntype, 1 male (62,4 mm SL); Wahai, Sumatra, Indonesia. MNHN 2016-0029, larva (11,4 mm SL), Moorea, Opunohu riv., French Polynesia, 11/2009, Sasal et al. coll; tag L-106. MNHN 2016-0030, 1 male (49,9 mm SL), Vage riv., Kolobangara, Solomon, 10/11/2015, Keith et al. coll; tag 12397. MNHN 2016-0031, 1 male (52,9 mm SL), Vanga riv., Kolobangara, Solomon, 1/11/2015, Keith et al. coll; tag 12487. MNHN 2016-0032, juvenile (32,8 mm SL), Zamba riv., Kolobangara, Solomon, 10/11/2015, Keith et al. coll; tag L-229. MNHN 2016-0033, juvenile (14,7 mm SL), Jack Harbour, Liva riv., Kolobangara, Solomon, 11/11/2015, Keith et al. coll; tag L-273.

E. acanthopoma (Bleeker, 1853) - RMNH 25934 holotype, 1 male (85,7 mm SL); Sumatra, Indonesia. MNHN 2016-0025, 1 male (48,9 mm SL), Moorea, French Polynesia, 06/2007, Salsa et al. coll; tag 16098. MNHN 2016 - 0026, 1 male (44,9 mm SL), Rarotonga, 07/2010, Keith et al. coll; tag 16005. MNHN 2016 -0027, 1 male (47,8 mm SL), Gaua, Kaska riv., Vanuatu, 05/11/2014, Mennesson et al. coll; tag 13546. MNHN 2016-0028, 3 juveniles (24,6; 19,3; 24,2 mm SL) Vanga riv., Kolobangara, Solomon, 18/11/2015, Keith et al. coll; tag L-247, L-248, L-252.

Acknowledgments

The study was made possible by a grant given to the French Ichthyological Society in the context of the ‘Critical Ecosystem Partnership Fund (CEPF)’ (Melanesia hotspot). The Critical Ecosystem Partnership Fund is a joint initiative of l’Agence Française de Développement, Conservation International, the Global Environment Facility, the Government of Japan, the MacArthur Foundation and the World Bank. A fundamental goal is to ensure civil society is engaged in biodiversity conservation.

We would like to acknowledge the customary landowners and tribes of Mount Maetambe to Kolobangara River Watershed for allowing the expedition team to enter their lands. We would like to thank the Lauru Land Conference of Tribal Community, Choiseul Province and the Solomon Islands Government for the support and facilitation of the legal process that have allowed the expedition team to conduct the scientific research in Choiseul Province, and of course ESSI (Ecological Solution Solomon Islands), which organised the trip very efficiently; and also the customary landowners, villages and tribes of Hunda-Kena, Jack Harbour, Poitete,

Lodumae and Vanga who welcomed us in Kolobangara Island and for allowing the expedition team to enter their lands. We would also like to thank KIBCA (Kolobangara Island Biodiversity Conservation Association) for the village meetings and the organisation of the trip. Finally, thanks to David Boseto, Rex Loka, Piokera Holland, Gérard Marquet and Clara Lord, our very efficient partners in the Kolobangara field work.

For the loan of specimens we thank: D. Catania (CAS), R. de Ruiter (RMNH), S. Dorow, H. Zetsche, T.J. Alpermann and F. Krupp (SMF), S. Morrison and G.R. Allen (WAM), R. Vonk and H. Praagman (ZMA), R. Hadiaty (MZB), S. Merker (SMNS), I. Eidus (ZMH), T. Heath and J. Maclaine (BMNH), L. Parenti, J. Williams, L. Palmer and S. Raredon (USNM), P. Pruvost, R. Causse, Z. Gabsi, C. Ferrara, M. Hauteceœur (MNHN). We would like to thank the “Service de systématique moléculaire” of the MNHN (CNRS UMS 2700) for the laboratory access and the assistance provided. And finally, we are grateful to G. Denys for his help with the manuscript.

Conclusion sur la découverte d'une nouvelle espèce d'*Eleotris* dans les îles Salomon

Bien que les campagnes de terrain effectuées par notre équipe de recherche aient débuté à la fin des années 1990, nous n'avons jamais eu l'occasion d'explorer les îles Salomon. Depuis 2014, nous avons eu l'opportunité d'y mener plusieurs missions, au cours desquelles de nouvelles espèces amphidromes ont été découvertes, dont une du genre *Eleotris*. Cette dernière s'est révélée être très proche morphologiquement d'*E. fusca*, mais le nombre d'écailles sur la ligne latérale et sur les séries transversale postérieure et zigzag permettent de l'en distinguer. L'apport de la génétique à travers le séquençage d'une partie partielle du gène mitochondrial *COI* permet de renforcer les résultats morfo-méristiques ; les deux analyses étant congruentes, nous avons réalisé une phylogénie des *Eleotris* de l'Indo-Pacifique dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

Phylogénie des *Eleotris* de l'Indo-Pacifique

Introduction

Au chapitre 2, nous avons revu la taxonomie du genre *Eleotris* dans l'Indo-Pacifique et mis au point une clé d'identification à partir d'une étude morpho-méristique. A partir de cette étude, **un total de 14 espèces a été validé** bien que des doutes persistent à l'encontre de certaines espèces.

Afin d'essayer d'approfondir et de renforcer nos résultats taxonomiques, nous avons réalisé une étude génétique visant à obtenir la meilleure phylogénie possible des *Eleotris* de l'Indo-Pacifique. Ainsi, ce 4^{ème} chapitre s'inscrit dans une approche de **taxonomie intégrative** ; ce qui nous permettra de délimiter et de valider les espèces d'*Eleotris* en s'appuyant sur la complémentarité et l'indépendance des jeux de données dont nous disposons *i.e.*, les données taxonomiques et les données moléculaires.

I. Matériel & Méthodes

1. Espèces incluses dans l'analyse génétique

Toutes espèces validées en morpho-méristique n'ont pu être incluses dans la phylogénie puisque certaines ne sont disponibles que par le type (*E. eigenmanni*, *E. balia*, *E. aquadulcis*, *E. vomerodentata* et *E. pellegrini*). Or, pour la plupart des musées, il est interdit de prélever les spécimens types afin de séquencer l'ADN et, lorsque l'autorisation est donnée pour cette analyse, on constate souvent que l'ADN est trop dégradé pour être séquencé. Néanmoins, nous avons eu l'autorisation du BMNH, pour séquencer l'ADN (avec succès) de l'holotype supposé d'*E. fornasini* (BMNH 1852.9.13.179).

Ainsi pour la réalisation des deux phylogénies qui seront présentées ici, 10 espèces d'*Eleotris* seront représentés : *E. bosetoi*, *E. fusca*, *E. melanosoma*, *E. cf. melanosoma* sp2 et sp3, *E. oxycephala*, *E. sandwicensis*¹, *E. acanthopoma*, *E. mauritiana* et, *E. cf. pellegrini*.

¹ N'ayant pas de spécimens de cette espèce, nous avons utilisé l'unique séquence *COI* disponible sur Genbank pour *E. sandwicensis* : AF391333.1.

Tableau 1 : Liste des espèces utilisées pour la phylogénie du genre *Eleotris*. Pour chaque espèce, le nombre de spécimens (N) est donné en fonction de leur localité d'échantillonnage.

Espèces	Localités	N	N total
<i>E. oxycephala</i>	Japon	1	1
<i>E. sandwicensis</i>	Hawaii	1	1
<i>E. mauritiana</i>	Seychelles	3	8
	Réunion	2	
	Maurice	1	
	Mayotte	2	
<i>E. acanthopoma</i>	Moorea	2	11
	Rarotonga	1	
	Vanuatu	2	
	Salomon	2	
	Indonésie	3	
	Pohnpei	1	
<i>E. cf. pellegrini</i>	Seychelles	4	7
	Madagascar	3	
<i>E. melanosoma</i>	Indonésie	7	18
	Salomon	4	
	Moorea	1	
	Okinawa	4	
	Mayotte	2	
<i>E. cf. melanosoma</i> sp	Vietnam	1	2
	Indonésie	1	
<i>E. bosetoi</i>	Salomon	4	4
<i>E. fusca</i>	Marquises	2	54
	Rurutu	3	
	Rarotonga	2	
	Tubuai	2	
	Moorea	2	
	Salomon	2	
	Vanuatu	2	
	Samoa	2	
	Nouvelle-Calédonie	2	
	Fidji	2	
	Okinawa	2	
	Philippines	1	
	Palau	1	
	Micronésie	2	
	Indonésie	2	
	Papua	2	
	Réunion	2	
	Mayotte	6	
	Mohéli	4	
	Madagascar	5	
Réunion	4		
Seychelles	2		
<i>E. fornasini</i> (Holotype BMNH 1852.9.13.179)	Mozambique	1	1

T = 107

Deux phylogénies des *Eleotris* seront réalisées à partir du génome mitochondrial. La première sera obtenue avec le séquençage d'un fragment du gène *COI* (585 pb) et la seconde avec 6 gènes obtenus du séquençage du mitogénome complet (7143 pb). Ainsi, un total de 107 spécimens d'*Eleotris* ont été choisis pour réaliser la 1^{ère} phylogénie du genre (Tableau 1) et un sous échantillonnage sera effectué parmi ces derniers pour la 2^{nde} phylogénie. Pour chaque espèce, toutes les localités dont nous disposons où l'espèce est présente, sont représentées par un ou plusieurs spécimens. Parmi les 107 spécimens de la 1^{ère} phylogénie, 6 sont des séquences nucléotidiques qui nous ont été fournies par K. Maeda (Université de Ryūkyū, Japon) (*Eleotris* notés de E1 à E6), 1 provient de Genbank (*E. sandwicensis*), 23 sont issus de tissus prélevés sur le terrain, 8 sont des post-larves et 64 sont issus d'individus entiers stockés dans les collections du MNHN. Les spécimens tagués BIF sont issus de l'étude réalisée par Dahrudin et al. (2016).

2. Extraction et amplification de l'ADN

a. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir de fragment de nageoire d'environ 1 mm² ; après avoir été séché, chaque fragment est déposé dans un puits d'une plaque de 96 puits. Les tissus sont ensuite digérés dans 20 mL de tampon de lyse (Lysis buffer) associé à 2,5 mL de protéinase K provenant du kit d'extraction NucleoSpin® 96 Tissue. Les échantillons sont ensuite placés dans une étuve à 57°C sous agitation pendant 12 à 24h. Après centrifugation, l'ADN est extrait grâce au robot Eppendorf epMotion 5075, semi-automatique. Ce dernier se fixe à une membrane de silicate chargée positivement et les produits de la lyse cellulaire sont filtrés 3 fois par aspiration avec un tampon à base d'éthanol, afin d'éliminer les impuretés et les restes de débris cellulaires. Les traces d'éthanol sont éliminées lors du séchage de la plaque par aspiration. Pour finir, l'ADN est élué par ajout de tampon Tris-HCl et est conservé à -20°C.

b. Amplification d'un fragment du gène *COI*

Les PCR sont réalisées dans un volume total de 20 µL avec 2 µL de tampon, 1 µL de DMSO (DiMéthyl SulfOxyde), 1 µL de BSA (Sérum d'Albumine Bovine), 0,8 µL d'un mélange dNTP (DésoxyNucléotide TriPhosphate), 0,32 µL de chaque amorce *forward* et *reverse* (Tableau 2), 0,06 µL de TAQ (ADN polymérase recombinante, Qiagen). Le volume restant est de l'eau.

L'amplification de l'ADN se fait à l'aide d'un thermocycleur (Biometra® ou Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler). Le programme de PCR est constitué de plusieurs étapes et est le même pour les deux fragments *COI* : i- dénaturation initiale (2 min à 94°C) suivie de 55 cycles comprenant les étapes 2,3 et 4 ; ii- dénaturation (25 s à 94°C) ; iii- hybridation des amorces (25 s à 54°C) ; iv- élongation (55 s à 72°C) et v- une élongation terminale (2 min à 72°C).

Une électrophorèse sur gel d'agarose (40 mL de TAE (Tris-acetate-EDTA), 0,8 g d'agarose ; 0,8 µL de Bet (un agent intercalant de l'ADN : Bromure d'Ethydium)) est réalisée afin de visualiser les produits de la PCR. Dans chaque puits du gel est déposé : 3 µL de chaque produit de PCR, 3 µL de témoin (PCR sans ADN) et 1,2 µL de marqueur de taille (XIV). La migration par électrophorèse permet de séparer les amplifias et de contrôler leur taille et leur qualité grâce aux UV, qui révèlent la présence du Bet.

Les produits de PCR sont ensuite envoyés au Genoscope (Centre National de Séquençage, Evry) et à Eurofins MWG Operon (Allemagne). Ces derniers y sont séquencés dans les deux sens à l'aide des amorces *forward* et *reverse* que nous leur fournissons.

Tableau 2 : Amorces utilisées pour l'amplification

Gène	Nom des amorces	séquence (5'-3')	Auteurs
<i>COI</i>	Tel F1	TCGACTAATCAYAAAGAYATYGGCAC	Dettai et al., 2011
<i>COI</i>	Tel R1	ACTTCTGGGTGNCCAAARAATCARAA	Dettai et al., 2011
Complete mitogenome	12S-L1091R	AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT	Kocher et al., 1989
Complete mitogenome	MtH7061	GGGTTATGTGGCTGGCTTGAAAC	Hinsinger et al., 2015
Complete mitogenome	MtL5231	TAGATGGGAAGGCTTCGATCCTACA	Hinsinger et al., 2015
Complete mitogenome	MtH11944	CATAGCTTTTACTTGGATTTGCACCA	Hinsinger et al., 2015
Complete mitogenome	MtL11910	CAGCTCATCCATTGGTCTTAGGAAC	Hinsinger et al., 2015
Complete mitogenome	12S-H1478	TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT	Hinsinger et al., 2015

c. Amplification du mitogénome complet

L'amplification du mitogénome complet consiste à le couper en 3 parties chevauchantes utilisant ainsi seulement 3 couples d'amorces (Tableau 2) pour obtenir environ 16 000 pb. Une 1^{ère} amorce appelée Mt1 va nous permettre d'amplifier du milieu du 12S jusqu'à ARNt-Ser ; l'amorce Mt2 du ARNt-Cys jusqu'à ARNt-Leu et l'amorce Mt3 du ARNt-Ser jusqu'au milieu du 16S (Chapitre 1, Fig. 11).

Les PCR sont réalisées dans un volume total de 18 µL incluant 5X de TAQ (ADN polymérase recombinante, HotStart LongAmp®), 0,4 ng/µL de BSA (Sérum d'Albumine Bovine), 3,5% de DMSO (DiMéthyl SulfOxyde), 300 nM de chaque amorce, 300 µM de dNTP (DésoxyNucléotide TriPhosphate). Le volume restant est de l'eau.

L'amplification de l'ADN se fait à l'aide d'un thermocycleur (Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler). Le programme de PCR est constitué de plusieurs étapes : i- dénaturation initiale (30 s à 94°C) suivie de 45 cycles comprenant les étapes 2,3 et 4 ; ii- dénaturation (20 s à 94°C) ; iii- hybridation des amorces (30 s à 62,5°C) ; iv- élongation (15 min à 65°C) et v- une élongation terminale (15 min à 65°C).

Une électrophorèse sur gel d'agarose (40 mL de TAE (Tris-acetate-EDTA), 0,3 g d'agarose ; 0,8 µL de Bet (un agent intercalant de l'ADN : Bromure d'Ethydium)) est réalisée afin de visualiser les produits de la PCR. Dans chaque puits du gel est déposé : 3 µL de chaque produit de PCR et 1,2 µL de marqueur de taille. La migration par électrophorèse permet de séparer les amplifias et de contrôler leur taille et leur qualité grâce aux UV, qui révèlent la présence du Bet.

3. Vérification, nettoyage et alignement des séquences

a. Fragment du gène *COI*

Au retour des centres de séquençage, les séquences sont nettoyées à l'aide du logiciel Geneious 9.0.5 (Kearse et al. 2012) puis alignées avec Muscle Alignment (implémenté dans Geneious). L'étude des chromatogrammes des séquences *reverse* et *forward* permet de corriger les parties 5' et 3' de la séquence finale.

Un arbre phylogénétique a été construit à partir de 107 séquences avec le logiciel MrBayes utilisant l'inférence bayésienne (MrBayes v.3.2; Ronquist et al. 2012). Les modèles d'évolution les plus adaptés au découpage du gène en fonction des positions de codons sont obtenus *via* PartitionFinder (Lanfear et al. 2012). Pour la 1^{ère} position de codon, c'est le modèle SYM + I qui a été choisi, pour la 2^{nde} le modèle F81 et pour la 3^{ème} le modèle GTR + G. L'arbre phylogénétique bayésien est réalisé à partir de 2 analyses de 10 millions de générations chacune, avec un échantillonnage des arbres toutes les 200 générations. La convergence des 2 analyses est vérifiée avec le logiciel TRACER v.1.6.0 (Rambaut & Drummond 2007). Les arbres sont synthétisés en appliquant la méthode du consensus majoritaire à 50% après avoir supprimé les 25 premiers pourcents des arbres obtenus (burnin à 25%). L'arbre obtenu est visualisé avec le logiciel FigTree v.1.4.2 (Rambaut 2007). Les pourcentages de différence entre les différents clades ont été calculés avec Geneious 9.0.5.

b. Mitogénome complet, mtDNA

Toute la méthode de séquençage pour l'obtention du génome mitochondrial complet est détaillée dans le chapitre 1 dans la partie « Analyses moléculaires » (p. 56).

Bien que les amorces Mt1, 2 et 3 conviennent au séquençage d'un grand nombre de Téléostéens, parfois elles ne fonctionnent pas sur la totalité du mitogénome. Nous avons réussi cependant à obtenir au total 35 mitogénomes complets et 7 partiels, pour lesquels le Mt2 n'est pas complet.

L'objectif étant d'obtenir la meilleure phylogénie possible, nous avons donc décidé de recentrer l'analyse sur les gènes mitochondriaux qui seront obtenus avec les amorces Mt1 et Mt3 afin d'utiliser le maximum de spécimens dans la phylogénie. La même méthode de nettoyage et d'alignement, que celle employée pour le fragment de gène *COI*, a été effectuée pour le mitogénome partiel. Pour cette analyse, nous avons donc choisi de concaténer les 6 gènes codants, *i.e.*, ND1, ND2, COI, ND5, ND6 et Cyt b (soit 7143 pb).

Un arbre phylogénétique a été construit à partir de 42 séquences avec le logiciel MrBayes utilisant l'inférence bayésienne (MrBayes v.3.2; Ronquist et al. 2012). Les modèles d'évolution les plus adaptés au découpage de chaque gène en 3 positions de codons sont

obtenus *via* PartitionFinder (Lanfear et al. 2012) (Tableau 3). L'arbre phylogénétique bayésien est réalisé à partir de 2 analyses de 10 millions de générations chacune, avec un échantillonnage des arbres toutes les 200 générations. La convergence des 2 analyses est vérifiée avec le logiciel TRACER v.1.6.0 (Rambaut & Drummond 2007). Les arbres sont synthétisés en appliquant la méthode du consensus majoritaire à 50% après avoir supprimé les 25 premiers pourcents des arbres obtenus (burnin à 25%). L'arbre obtenu est visualisé avec le logiciel FigTree v.1.4.2 (Rambaut 2007). Les pourcentages de différence entre les différents clades ont été calculés avec Geneious 9.0.5.

Tableau 3 : Liste des modèles bayésiens pour chaque gène étudié en fonction des trois positions de codons.

Gènes	Longueur (pb)	Positions de codons	Modèles BIC
ND1	975	première	GTR + G
		seconde	HKY + I
		troisième	GTR + I + G
ND2	1047	première	GTR + I + G
		seconde	GTR + I + G
		troisième	GTR + G
COI	1563	première	GTR + I + G
		seconde	GTR + I + G
		troisième	GTR + I + G
ND5	1839	première	GTR + G
		seconde	HKY + I
		troisième	GTR + I + G
ND6	522	première	HKY + I + G
		seconde	HKY + I + G
		troisième	HKY + I + G
Cyt b	1197	première	GTR + G
		seconde	HKY + I
		troisième	GTR + I + G

II. Résultats

1. 1^{ère} phylogénie obtenue à partir d'un fragment du gène *COI* (585 pb)

A partir de la phylogénie issue du séquençage du gène *COI* et présentant des nœuds fortement soutenus (probabilités postérieures (PP) comprises entre 1 et 0,72) (Fig. 1), nous pouvons constater que la séquence d'*E. oxycephala* se retrouve en dehors des clades d'*Eleotris* (avec 16,4% de divergence) et plus précisément, avec les deux espèces d'Eleotridae constituant la racine de l'arbre (*Belobranthus belobranthus* et *Bunaka gyrinoides*).

Deux clades se constituent ensuite (avec 13% de divergence), le **clade I** composé des spécimens initialement identifiés comme *E. fusca* ainsi que *E. fornasini* et le **clade II** composé des autres espèces initialement identifiées comme *E. melanosoma*, *E. cf. melanosoma* sp2 et sp3, *E. bosetoi*, *E. acanthopoma*, *E. cf. pellegrini* et *E. sandwicensis*.

Au sein du **clade I**, deux groupes sont clairement distincts (6,5% de différence), les spécimens échantillonnés dans l'océan Indien (**I₁**) et ceux dans l'océan Pacifique (**I₂**) (exceptés deux individus issus de la Réunion, n° 11823 et 11825). Pour distinguer les deux entités, les spécimens du clade **I₂** seront appelés *E. fusca* (localité type Polynésie Française, Pacifique) tandis que ceux du clade **I₁**, seront appelés *E. cf. fusca* (ce taxon n'avait a priori pas été décelé en première approche par la morpho-méristique).

Le **clade II** se divise en deux sous-clades, un sous-clade **A** et un sous-clade **B** qui se différencient par 14% de divergence. Le **A** est composé de deux groupes distincts, le groupe **A₁** constitué d'une part, d'*E. sandwicensis* et d'autre part, des spécimens d'*E. acanthopoma* et *E. mauritiana* tous confondus ; et le groupe **A₂** formé par les spécimens d'*E. cf. pellegrini*. Entre *E. sandwicensis* et le groupe *E. acanthopoma-mauritiana* seul 1,2% les séparent tandis que 10% de différence sépare le groupe **A₁** du **A₂**.

Le sous-clade **B** se compose de 3 branches :

- **B₁** constituée de 2 spécimens (provenant d'Indonésie et du Vietnam) que nous avons appelés *E. cf. melanosoma* sp3 lors de l'analyse morpho-méristique ; cette branche diverge de la **B₂** et de la **B₃** par respectivement 11% et 12%.
- **B₂** constituée des spécimens d'*E. bosetoi* et se différencie de la **B₃** par 11% de divergence.
- **B₃** constituée de deux groupes qui divergent de 12,4%, le 1^{er} groupe **B₃**** est uniquement composé de deux individus provenant de l'océan Indien (Mayotte) que nous avons appelés *E. cf. melanosoma* sp2 et, le 2nd groupe **B₃*** se divise en deux

entités (divergentes de 5,3%) avec d'un côté des spécimens issus d'Indonésie et des îles Salomon et de l'autre, issus de Moorea (Polynésie Française) et d'Okinawa (Japon). Etant donné la localité type de l'espèce *E. melanosoma* (i.e., Sumatra, Indonésie, cf. chapitre 2, Tableau 19), nous nommerons les entités provenant d'Indonésie et des îles Salomon, *E. melanosoma* et les autres *E. cf. melanosoma* sp1 (taxon non décelé par l'analyse morpho-méristique puisque nous n'avons qu'une post-larve).

La phylogénie des *Eleotris* de l'Indo-Pacifique s'annonce donc plus complexe que nous le pensions, elle laisse apparaître un nombre potentiel de 4 espèces cryptiques. En effet, l'espèce *E. fusca* serait en réalité un complexe de deux espèces, *E. fusca* et *E. cf. fusca* ; sous le nom d'*E. melanosoma* seraient présentes 4 entités distinctes : l'espèce type *E. melanosoma* présente dans l'océan Pacifique, *E. cf. melanosoma* sp1 présente aussi dans l'océan Pacifique, *E. cf. melanosoma* sp2 présente dans l'océan Indien, et *E. cf. melanosoma* sp3 restreinte à l'Asie du Sud-Est. ; *E. acanthopoma* et *E. mauritiana* sont confondues dans le même clade (et sont donc une seule et même espèce i.e., *E. acanthopoma*), *E. sandwicensis* n'étant séparé de ces derniers que par 1,2% pourrait aussi appartenir à la même espèce. Le cas d'*E. cf. pellegrini* n'est pas encore résolu. Enfin, *E. oxycephala* n'est pas incluse dans le clade des *Eleotris*.

La réalisation d'une 2^{nde} phylogénie à partir d'un plus grand nombre de gènes nous permettra sans doute de mieux appréhender les liens entre toutes les espèces d'*Eleotris* et ainsi de pouvoir tirer des conclusions plus précises.

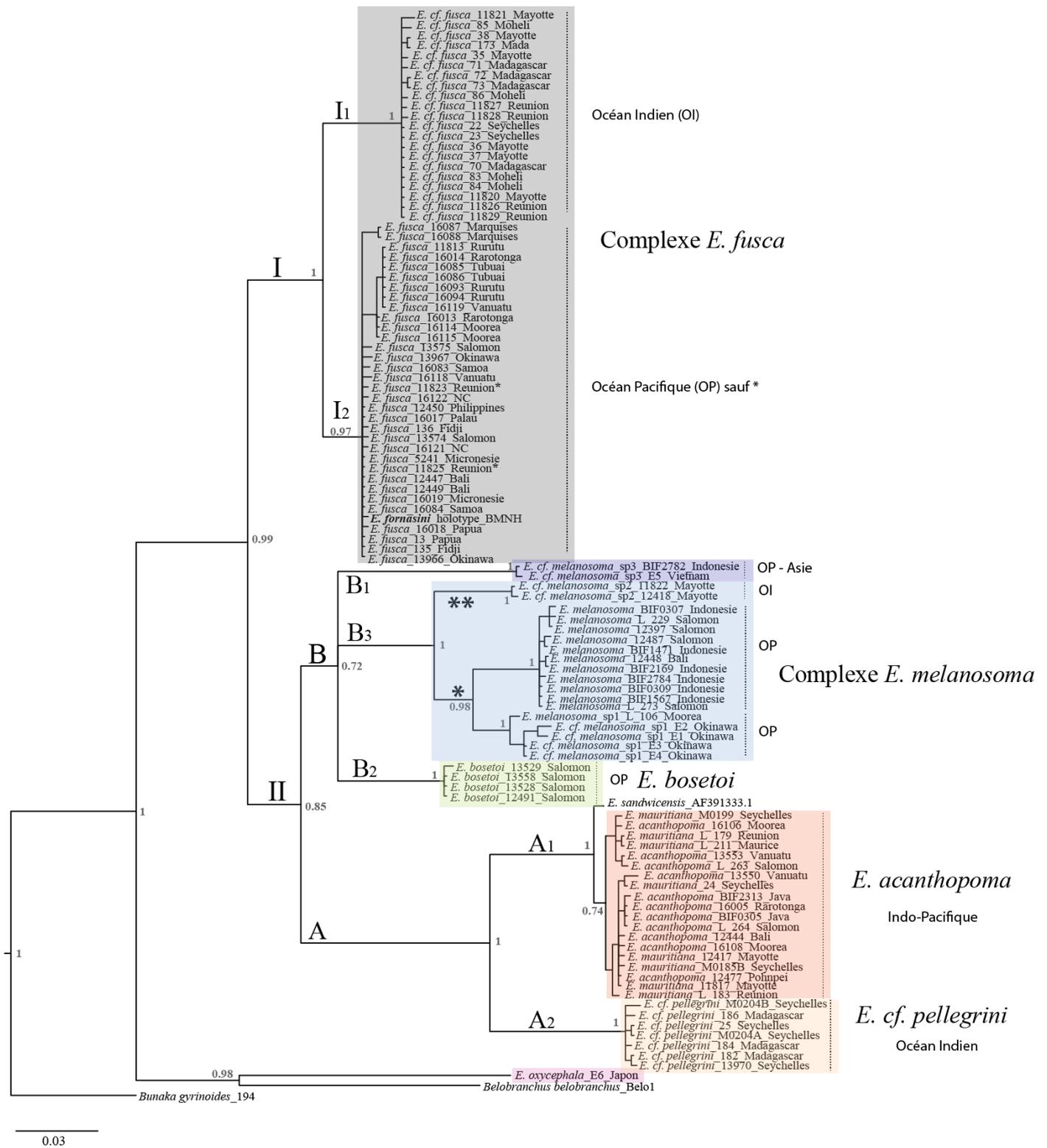


Figure 1 : Arbre phylogénétique des *Eleotris* construit par inférence bayésienne à partir d'un fragment du gène *COI* (585 pb). La robustesse des branches de chaque clade est donnée par les valeurs de probabilités postérieures exprimées en décimale.

2. 2^{ème} phylogénie obtenue à partir du mitogénome partiel (7143 pb)

a. Approche moléculaire

Au total 35 mitogénomes complets et 7 partiels ont été obtenus. En génome complet, 23 sont des *E. fusca*, 6 des *E. cf. fusca*, un seul *E. acanthopoma*, 2 des *E. bosetoi*, 2 des *E. melanosoma* et un seul *E. cf. melanosoma* sp1 ; et en partiel, 2 *E. cf. fusca*, un *E. fusca*, un *E. acanthopoma*, un *E. cf. pellegrini*, un *E. cf. melanosoma* sp3 et, un *E. cf. melanosoma* sp1.

La phylogénie réalisée à partir du mitogénome partiel *i.e.*, à partir de 6 gènes concaténés, ne présente pas tout à fait la même topologie que celle obtenue avec le fragment du gène *COI* néanmoins la même architecture se dégage et, tous les nœuds sont fortement supportés (PP comprises entre 1 et 0,9) (Fig. 2). Pour faciliter la lecture, nous avons gardé les mêmes lettres (A, B, D) pour caractériser les mêmes clades que dans la phylogénie *COI*.

Tout comme la 1^{ère} phylogénie, *E. oxycephala* se retrouve aussi en dehors des clades des *Eleotris* (17% de divergence), avec les deux autres Eleotridae, *Bostrychus sinensis* et *Oxyeleotris marmorata*² en position de racine de l'arbre.

Les *Eleotris* se séparent en deux clades distincts, le clade **A** et le clade **C** avec 17% de divergence. Le premier clade se compose d'un groupe **A₂** constitué d'un spécimen d'*E. cf. pellegrini* et, d'un groupe **A₁** constitué de deux spécimens d'*E. acanthopoma*. Le second clade se compose de deux sous-clades **I** et **B** se distinguant par 13% de divergence. Le sous-clade **I** est constitué du complexe *E. fusca* présentant la même topologie que dans la 1^{ère} phylogénie, un groupe océan Indien (**I₁**) et un groupe océan Pacifique (**I₂**) qui sont différents à 6,5%. Comme pour la 1^{ère} phylogénie, le sous-clade **B** comporte 3 branches (**B₁**, **B₂**, **B₃**) correspondant aux mêmes entités, mais n'ayant pu séquencer les mitogénomes des *E. cf. melanosoma* sp2 (deux spécimens de Mayotte), ces derniers sont absents de la branche **B₃**. Les taux de divergence entre ces trois groupes sont similaires à ceux obtenus avec la 1^{ère} phylogénie : **B₁** diffère de **B₂** par 12%, ces derniers diffèrent eux même de **B₃** avec 11% et, les deux entités de la branche **B₃** se distinguent par 6% de divergence.

Cette 2^{nde} phylogénie, réalisée sur un plus grand nombre de gènes que la première et soutenue par des PP proches de 1, permet de confirmer que nous sommes bien face à

² Les mitogénomes complets de ces deux Eleotridae sont disponibles dans les bases de données Genbank et MitoFish.

plusieurs espèces cryptiques concernant les complexes *E. fusca* et *E. melanosoma*. En effet, quatre ou cinq espèces cryptiques se distinguent dans les phylogénies, *E. cf. fusca*, *E. cf. melanosoma* sp1, sp2, sp3 et peut être *E. cf. pellegrini* ; pour cette dernière, l'absence de possibilité de séquençage du type est pénalisant pour trancher sur son statut. La place d'*E. oxycephala* reste à être confirmée en resituant cette espèce dans la phylogénie des Eleotridae.

b. Morphologie vs. Phylogénie

A partir de cette 2nde phylogénie, nous avons superposé les critères de papilles sensorielles céphaliques que nous avons étudiés dans le chapitre 2 (Fig. 3). Nous constatons que la phylogénie révèle une différence dans leur agencement, en effet les deux clades **A** et **C** présentent des patterns de papilles sensorielles différents sur l'opercule, pour le clade **A** c'est le pattern « ouvert » et le « fermé » pour le clade **C**. **La phylogénie obtenue reflète donc la nature des papilles operculaires.** Nous pouvons aussi noter que *E. oxycephala* présente aussi un pattern « ouvert », laissant ainsi supposer que l'ancêtre commun des *Eleotris* devait posséder un tel pattern.

En revanche, la phylogénie ne reflète pas le type de papilles sensorielles infraoculaires puisque le pattern « 2.4.6 » se trouve dans deux clades différents (**I** et **B**).

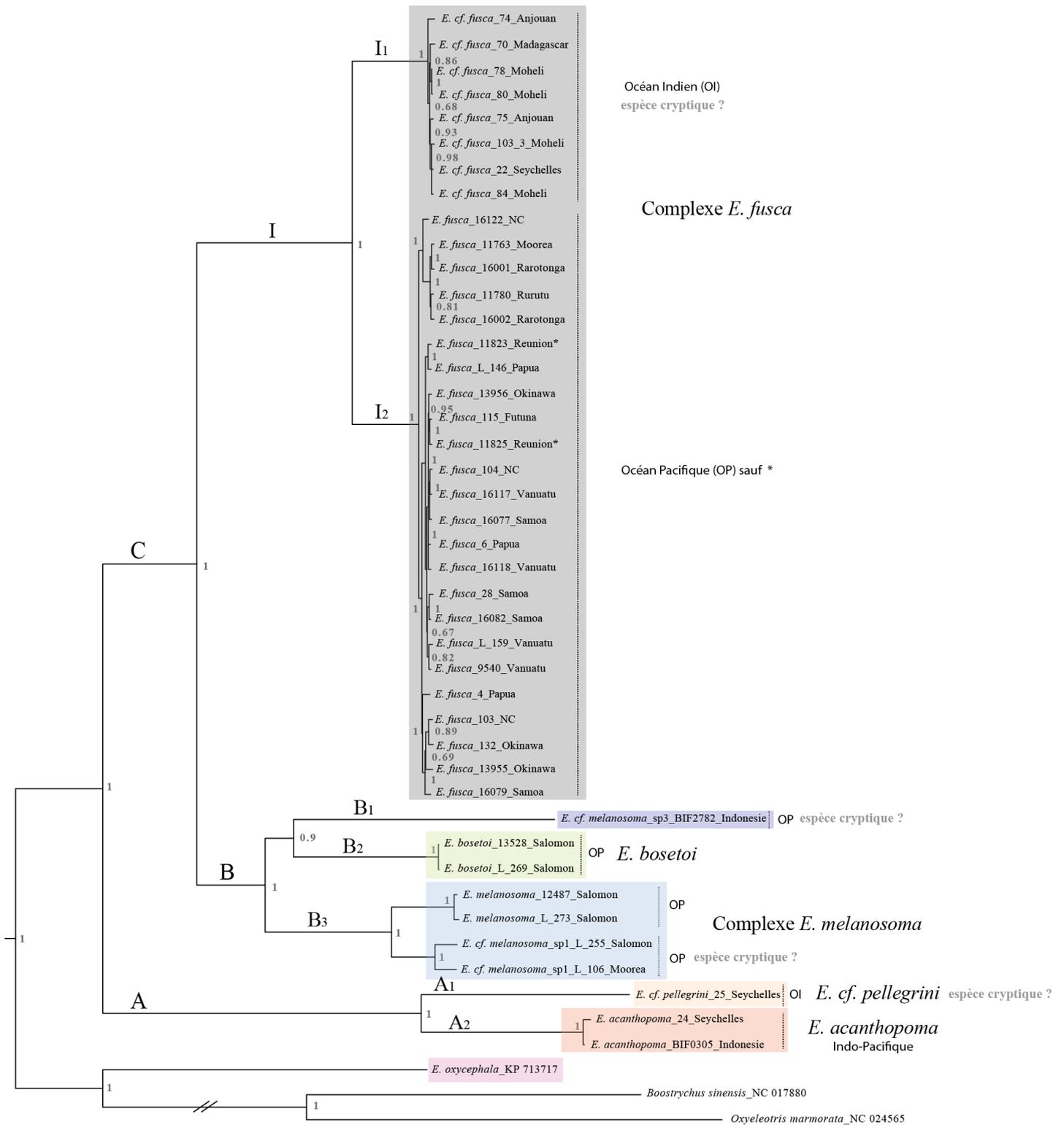
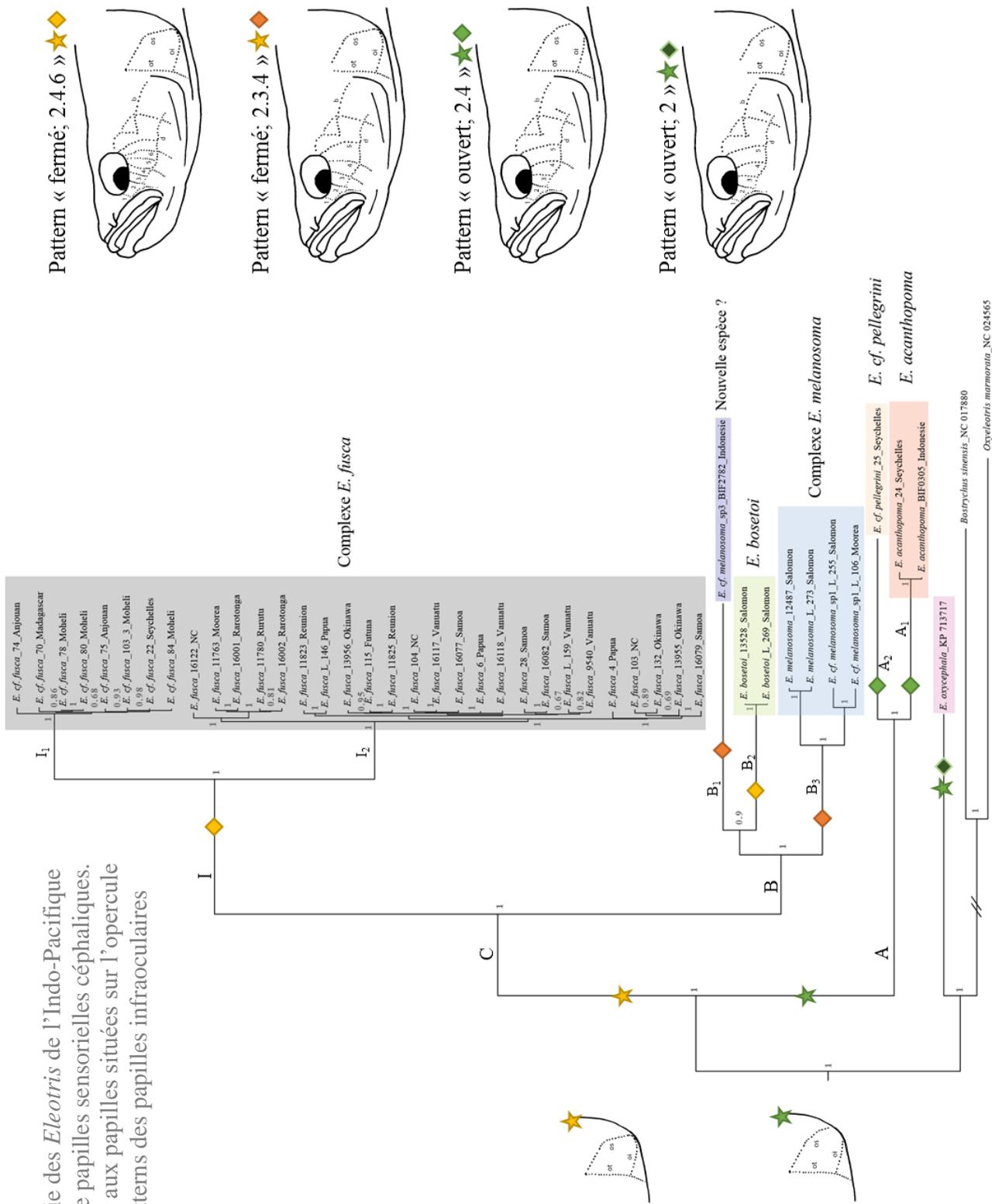


Figure 2 : Arbre phylogénétique des *Eleotris* construit par inférence bayésienne à partir du mitogénome partiel (7143 pb). La robustesse des branches de chaque clade est donnée par les valeurs de probabilités postérieures exprimées en décimale.

Figure 3 : 2nde phylogénie des *Eleotris* de l'Indo-Pacifique superposée aux critères de papilles sensorielles céphaliques. Les étoiles correspondent aux papilles situées sur l'opercule et, les losanges aux patterns des papilles infraoculaires



III. Discussion & Conclusion

Nos travaux montrent, avec des nœuds soutenus, que les *Eleotris* de l'Indo-Pacifique constituent un groupe monophylétique constitué de deux groupes (*cf.* phylogénie basée sur le mtDNA), un 1^{er} groupe **A** rattaché à l'ancêtre commun des sous-clades A₁ et A₂ (*E. acanthopoma* et *E. cf. pellegrini*) et un 2nd **C** à l'ancêtre des sous-clades I et B (complexe *E. fusca* et *E. melanosoma*) chacun correspondant à un pattern différent de papilles sensorielles céphaliques situé sur l'opercule. Nos travaux mettent donc en évidence, de façon tout à fait nouvelle, que **la phylogénie des *Eleotris* reflète l'évolution de leurs papilles operculaires.**

La place d'*E. oxycephala* (potentiel 3^{ème} groupe) dans la phylogénie reste à discuter comme l'indiquent les résultats de certaines phylogénies publiées sur les Eleotridae et les Gobioidae. En effet, la phylogénie des Eleotridae réalisée sur le gène *Cyt b* par Wei et al. (2013) (Fig. 4) a mis en évidence la paraphylie de la famille et la monophylie des *Eleotris* ainsi que la présence d'*E. oxycephala* à la base de l'origine du genre. En 2010, Agorreta et Rüber ont testé la robustesse de plusieurs phylogénies de Gobioidae publiées au début du 20^{ème} siècle en utilisant les nouvelles techniques de reconstructions moléculaires basées sur la parcimonie. Parmi ces phylogénies, ce sont celles réalisées à partir du jeu de données de Akihito et al. (2000) [gène du *Cyt b*] et de Wang et al. (2001) [ARNr du 12S] qui nous ont intéressées car elles incluent 4 des espèces d'*Eleotris* que nous étudions (*E. fusca*, *E. melanosoma*, *E. acanthopoma* et *E. oxycephala*) (Fig. 5). La phylogénie des Gobioidae basée sur les travaux de Akihito et al. (2000) présente une paraphylie des Eleotridae et des *Eleotris* ainsi que l'isolement d'*E. oxycephala* par rapport à ces derniers. Les mêmes résultats sont obtenus avec la phylogénie (mieux soutenue) basée sur les travaux de Wang et al. (2001). Ceci suggérant que *E. oxycephala* n'aurait pas sa place dans le genre *Eleotris*.

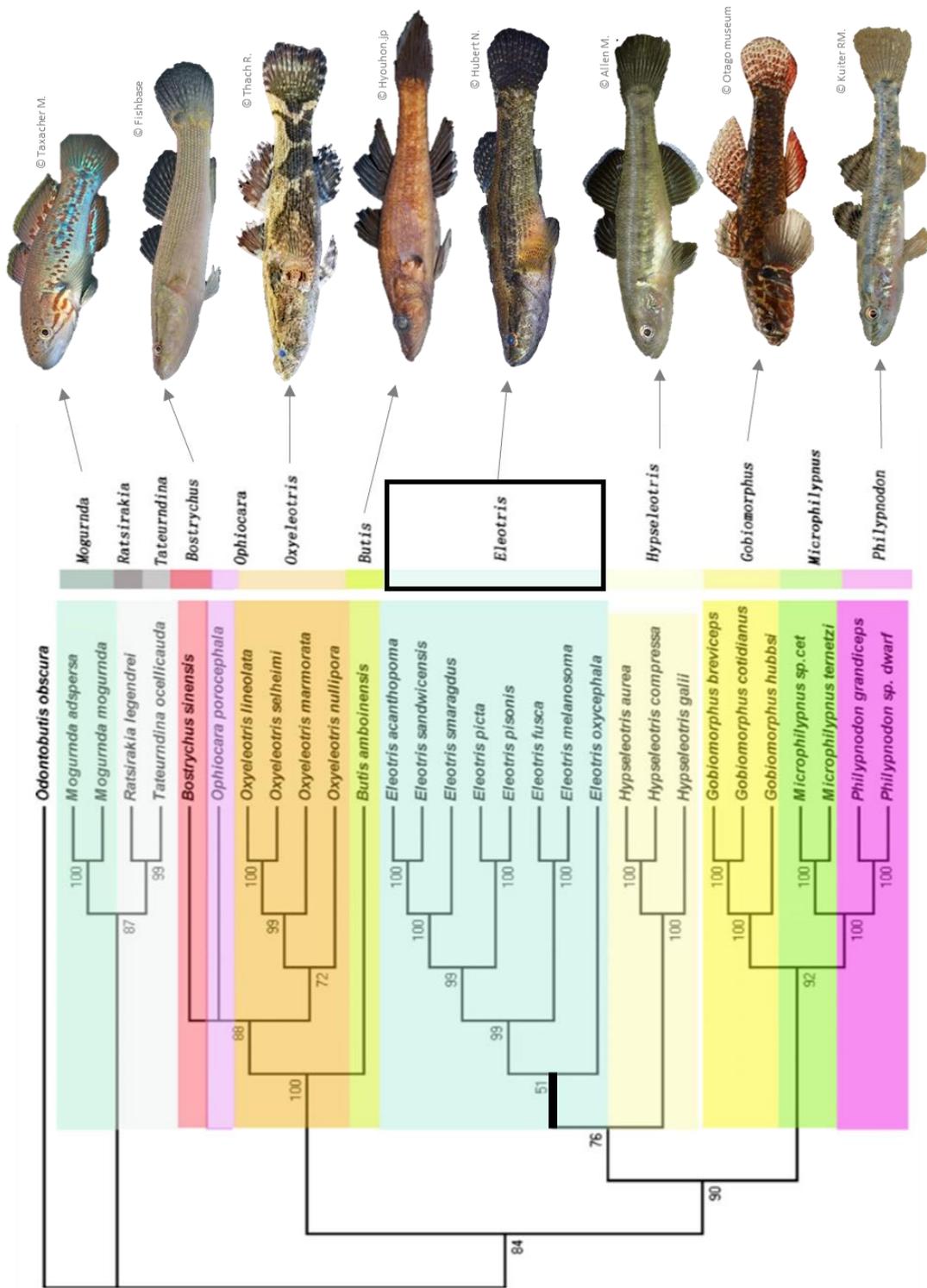
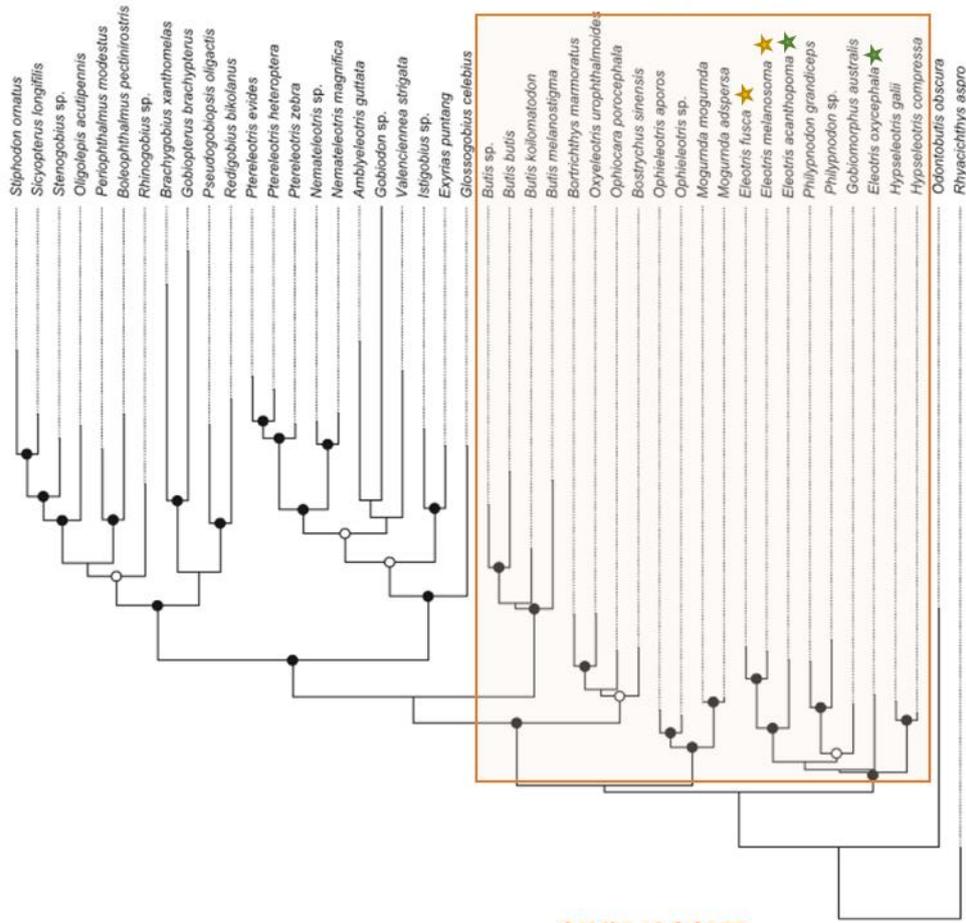


Figure 4 : Arbre phylogénétique des Eleotridae construit par inférence bayésienne à partir de séquences du Cyt b, modifié d'après Wei et al. (2013).

Avec les données de Wang et al. (2001)



Avec les données de Akihito et al. (2000)

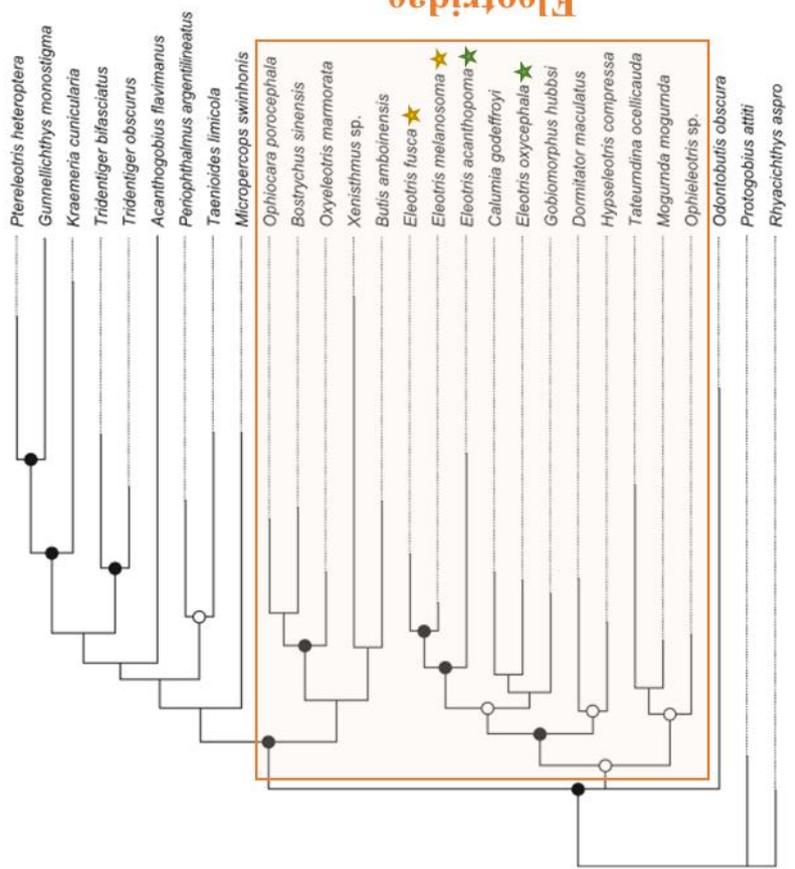


Figure 5 : Arbres phylogénétiques des Gobioidéi réalisés à partir des jeux de données de Akihito et al. (2000) et Wang et al. (2001) basés respectivement sur le gène Cyt b et l'ARNr 12S. La famille des Eleotridae est encadrée en orange. ● correspond aux nœuds les plus soutenus ; ○ correspond aux nœuds un peu moins soutenus ; l'absence de cercle indique que les nœuds ne sont pas soutenus. Les étoiles suivent les patterns de papilles sensorielles céphaliques de la Fig. 3.

Lors de notre étude taxonomique, nous avons mis en évidence que *E. mauritiana* était synonyme d'*E. acanthopoma* et ceci a été confirmé avec la phylogénie (clade A, sous-clade A₁). *E. acanthopoma* est donc une espèce à large répartition de l'océan Indien à l'océan Pacifique.

Pour les spécimens d'*E. cf. pellegrini*, la phylogénie permet de confirmer qu'il ne s'agit pas d'*E. acanthopoma* (10% de divergence) cependant, n'ayant pu séquencer le type d'*E. pellegrini*, nous ne pouvons certifier qu'il s'agisse bien d'une nouvelle espèce, les données morpho-méristiques ne permettant pas de trancher avec certitude.

Bien que seulement 1,2% sépare *E. acanthopoma* d'*E. sandwicensis*, laissant penser à une divergence récente entre ces deux espèces, nous pensons que ces deux espèces sont valides du fait de leurs morphologies qui sont distinctes (voir le nombre d'écailles Lse, PD, TRB, ZZ et le nombre de rayons sur la D₂).

Au sein du clade C, nous pouvons constater la présence de 4 espèces cryptiques, une au sein du complexe *E. fusca* et 3 autres au sein du complexe *E. melanosoma*. Parmi ces espèces cryptiques, nous avons mis en évidence la présence de 3 entités sous le nom d'*E. melanosoma* (une localisée en Asie (sp3), une autre dans l'océan Indien (sp2) et une dernière dans l'océan Pacifique (espèce vraie ?). Cependant, la phylogénie nous donne la présence d'une 4^{ème} espèce, au sein de l'espèce de l'océan Pacifique, que nous avons appelée *E. cf. melanosoma* sp1. Le même constat est observé au sein du complexe « *fusca* » où l'étude morphologique ne nous avait pas permis de mettre en évidence, *a priori*, la présence d'une espèce cryptique, *E. cf. fusca* présente uniquement dans l'océan Indien.

A partir des phylogénies basées sur un fragment du gène *COI* (585 pb) et sur une partie partielle du génome mitochondrial (7143 pb), nous avons pu observer que la taxonomie des *Eleotris* de l'Indo-Pacifique semblait donc plus complexe que ce que à quoi nous nous attendions. En effet, nous avons mis en évidence ou confirmé la présence de plusieurs espèces cryptiques initialement placées sous les noms d'espèces *E. fusca* (*E. cf. fusca*) et *E. melanosoma* (*E. cf. melanosoma* sp1, 2 et 3). La taxonomie basée sur la morpho-méristique nous laissait penser à la présence possible de trois entités sous le nom d'*E. melanosoma* et la génétique nous en a dévoilé 4. Une nouvelle phylogénie réalisée avec un plus grand nombre

de spécimens appartenant à *E. oxycephala*, *E. cf. melanosoma* sp1, 2 et 3, nous permettrait de renforcer les résultats obtenus.

Une phylogénie avec le gène nucléaire de la rhodopsine (*Rh*) avait été amorcée mais certaines espèces d'*Eleotris* n'ont pas fonctionné. Il serait intéressant de travailler sur un nouveau gène nucléaire qui serait assez variable pour confirmer les différentes espèces entre elles.

L'addition de nos résultats morpho-méristiques et génétiques nous permet d'établir la liste finale des taxons valides (ici, 16 au total en considérant *E. cf. pellegrini* comme une espèce cryptique) et des synonymes (Tableau 4).

La clé de détermination des *Eleotris* faite à l'issue de la morpho-méristique a donc été mise à jour (*cf.* l'encadré ci-après) ; néanmoins, les données morphologiques concernant *E. cf. melanosoma* sp1 ne peuvent y être intégrées car le seul spécimen en notre possession est une larve (pour rappel, les autres spécimens sont des séquences fournies par K. Maeda).

Nos travaux font une **mise à jour complète du statut des *Eleotris* présents dans l'Indo-Pacifique** et permettent d'avoir **une vision réelle du nombre d'espèces présentes et de leurs distributions. Ils mettent fin à plus d'un siècle de confusion.**

Les résultats de ce chapitre finalisent ainsi la liste des espèces d'*Eleotris* de l'Indo-Pacifique et révèlent la **présence de plusieurs espèces cryptiques**. Toutes n'ont cependant pu être décrites au cours de cette thèse mais leurs descriptions devraient être réalisées prochainement.

Les problèmes de taxonomie étant résolus, nous avons choisi d'**étudier plus en détail le complexe *E. fusca*** qui présente une distribution large dans l'Indo-Pacifique, et est composé de deux espèces cryptiques. Il constitue aussi le complexe pour lequel nous disposons du plus grand nombre d'échantillons. Dans le chapitre suivant, nous étudierons ainsi la **phylogéographie de ce complexe**, que nous comparerons ensuite à celle obtenue pour *E. acanthopoma* autre espèce à large répartition. Dans le 6^{ème} chapitre, nous statuerons sur les noms appropriés à chacune de ces deux espèces du complexe « *fusca* ». Et enfin, nous terminerons par l'étude de certains traits d'histoire de vie de ces espèces à partir de leurs otolithes (chapitre 7).

Tableau 4 : Nouvelle liste des espèces valides d'*Eleotris* de l'Indo-Pacifique. Les noms d'espèces sont regroupés en fonction des combinaisons de patterns de papilles sensorielles (code couleurs de la Fig. 3, chapitre 2) et classés par date de publication. Les noms valides sont surlignés en **jaune** et celui en **jaune pâle** est à confirmer. Le symbole x signifie que l'absence de type n'a pas permis de statuer sur le nom de l'espèce.

Nom valide	Auteur(s)	Localité type	Type(s)	Statut de l'espèce
<i>Eleotris fusca</i>	Bloch & Schneider, 1801	Raiatea, French Polynesia	Type à définir ?	espèce valide
<i>E. cf. fusca</i>	en attente	Océan Indien	–	espèce valide
<i>Poecilia fusca</i>	Bloch & Schneider, 1801	Polynésie Française	Pas de type	x
<i>Cheilodipterus culius</i>	Hamilton, 1822	India, Bengal	Pas de type	x
<i>Eleotris niger</i>	Quoy & Gaimard, 1824	Indonesia, Waigeo	Syntype	synonyme d' <i>E. fusca</i>
<i>Eleotris brachyurus</i>	Bleeker, 1849	Southern Java, Patjitan	Syntypes	x
<i>Eleotris fornasini</i>	Bianconi, 1857	Mozambique	Holotype	synonyme d' <i>E. fusca</i>
<i>Eleotris incerta</i>	Blyth, 1860	India (OI)	Pas de type	x
<i>Eleotris cavifrons</i>	Blyth, 1860	Andaman Island (OI)	Pas de type	x
<i>Eleotris vitianus</i>	Sauvage, 1880	Fiji Islands	Syntypes	synonyme d' <i>E. fusca</i>
<i>Eleotris klunzingerii</i>	Pfeffer, 1893	Zanzibar	Holotype (photos)	synonyme d' <i>E. fusca</i>
<i>Eleotris andamensis</i>	Herre, 1939	Andaman Island	Paratypes	synonyme d' <i>E. fusca</i>
<i>Eleotris bosetoi</i>	Menesson et al., 2016	Solomon Island	Holotype	espèce valide
<i>Eleotris melanura</i>	Bleeker, 1849	Southern Java, Pasuruan	Type ?	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Eleotris melanosoma</i>	Bleeker, 1853	Western Sumatra, Wahai	Syntypes	espèce valide
<i>Eleotris pseudacanthopomus</i>	Bleeker, 1853	Western Sumatra	Holotype	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Culius macrocephalus</i>	Bleeker, 1857	Indonesia - Buru	Holotype	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Eleotris soaresi</i>	Playfair, 1867	Mozambique	Syntypes	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Culius insulindicus</i>	Bleeker, 1875	Indonesia - Sumatra	Syntypes	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Culius macrolepis</i>	Bleeker, 1875	Indonesia - Ambon	Syntypes	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Eleotris fortis</i>	Tanaka, 1912	Taiwan	Type perdu	x
<i>Eleotris hainanensis</i>	Chen, 1933	China	Pas de type	x
<i>E. cf. melanosoma</i> sp1	–	–	–	espèce valide
<i>E. cf. melanosoma</i> sp2	–	Mayotte	–	espèce valide
<i>E. cf. melanosoma</i> sp3	–	Bali	–	espèce valide
<i>Eleotris eigenmanni</i>	Popta, 1921	Indonesia	Lecto et Paralectotypes	espèce valide
<i>Eleotris acanthopoma</i>	Bleeker, 1853	Sumatra	Holotype	espèce valide
<i>Eleotris mauritiana</i>	Bennett, 1832	West Indian Ocean	Holotype ?	synonyme d' <i>E. acanthopoma</i>
<i>Eleotris sandwicensis</i>	Vaillant & Sauvage 1875	Hawaiian Islands	Syntypes	espèce valide
<i>Eleotris aquadulcis</i>	Allen & Coates, 1990	Papua	Paratypes	espèce valide
<i>Eleotris pellegrini</i>	Maugé, 1984	Madagascar	Syntypes	espèce valide
<i>Eleotris vomerodentata</i>	Maugé, 1984	Madagascar	Holotype	espèce valide
<i>E. cf. pellegrini</i>	–	Madagascar & Seychelles	–	espèce valide ?
<i>Eleotris oxycephala</i>	Temminck & Schlegel, 1845	Japon	Possible syntype	espèce valide
<i>Eleotris cantherius</i>	Richardson, 1846	China	Pas de type	x
<i>Eleotris balia</i>	Jordan & Seale, 1905	Japon & Chine	Holotype	espèce valide
<i>Eleotris lutea</i>	Day, 1876	Andaman Island	Syntypes	x
<i>Eleotris pallida</i>	Castelnau, 1875	Australia	Pas de type	x
<i>Eleotris fasciatus</i>	Chen, 1964	Taiwan	Pas de type	x

Clé de détermination des *Eleotris* de l'Indo-Pacifique

- 1a** – Les rangées longitudinales de papilles sensorielles céphaliques *os* et *oi* se rejoignent près du bord supérieur de l'opercule (Fig. 1a)**2**
- 1b** – Les rangées longitudinales de papilles sensorielles céphaliques *os* et *oi* ne se rejoignent pas près du bord supérieur de l'opercule (Fig.1b).....**3**

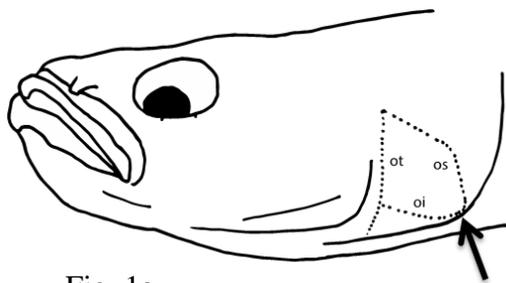


Fig. 1a

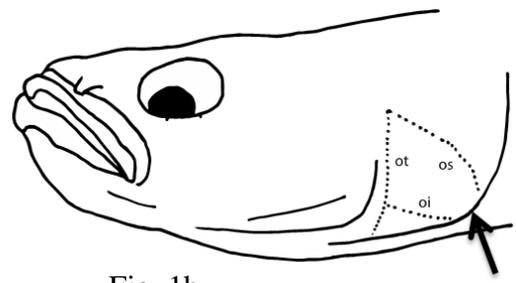


Fig. 1b

- 2a** – Les rangées de papilles sensorielles céphaliques infraoculaires 2, 4 et 6 dépassent la ligne horizontale d (Fig. 2a).....**4**
- 2b** – Les rangées de papilles sensorielles céphaliques infraoculaires 2, 3 et 4 dépassent la ligne horizontale d (Fig. 2b).....**5**
- 2c** – Les rangées de papilles sensorielles céphaliques infraoculaires 2, 4, 5 et 6 dépassent la ligne horizontale d (Fig. 2c).....***E. eigenmanni***.

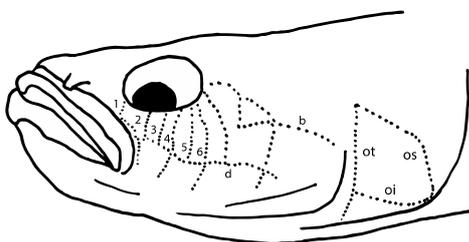


Fig. 2a

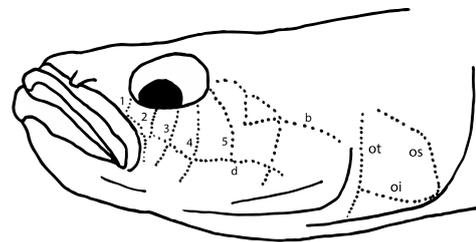


Fig. 2b

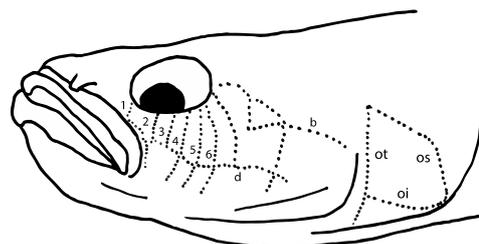


Fig. 2c

- 3a** – La rangée de papilles sensorielles céphaliques infraoculaires 2 dépasse la ligne horizontale d (Fig.3a).....**6**
- 3b** – Les rangées de papilles sensorielles céphaliques infraoculaires 2 et 4 dépassent la ligne horizontale d (Fig. 3b).....**7**

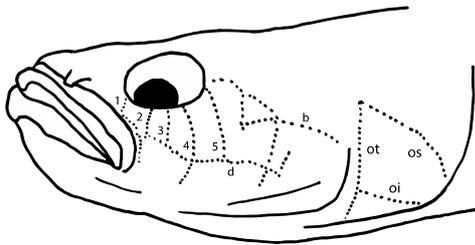


Fig. 3b

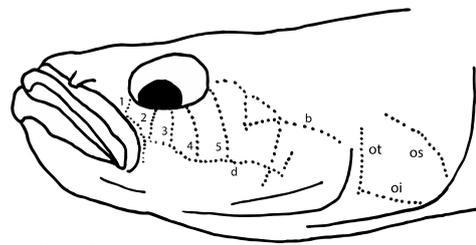


Fig. 3a

- 4a** – Le nombre d’écailles i- sur la ligne latérale est inférieur à 47, ii- sur la série transverse postérieure est inférieure ou égal à 13, iii- sur la série zigzag est inférieur à 12 et iv- le nombre de rayons sur les nageoires pectorales est compris entre 16 et 17 ***E. bosetoi***.
- 4b** – Le nombre d’écailles i- sur la ligne latérale est supérieur à 52, ii- sur la série transverse postérieure est supérieure ou égal à 13, iii- sur la série zigzag est supérieur ou égale à 12 et iv- le nombre de rayons sur les nageoires pectorales est de 18.....**8**
- 5a** – Le nombre de rayons sur les nageoires pectorales est de 19 ***E. cf. melanosoma sp3***.
- 5b** – Le nombre de rayons sur les nageoires est compris entre 15 et 18**9**
- 6a*** – Les mesures de %SDL, %AL, et %CL sont respectivement en fonction de la LS de 40%, 37% et 29%. Et le nombre de rayons sur les nageoires pectorales est de 18.....***E. oxycephala***.
- 6b*** – Les mesures de %SDL, %AL, et %CL sont respectivement en fonction de la LS de 26%, 25% et 18%. Et le nombre de rayons sur les nageoires pectorales est de 15.....***E. balia***.
- 7a** – Le nombre d’écailles i- sur la ligne latérale est compris entre 45 et 60, ii- sur la série transverse postérieure est compris entre 14 et 19, iii- sur la série zigzag est compris entre 10 et 16 **10**

7b – Le nombre d’écailles i- sur la ligne latérale est compris entre 37 et 38, ii- sur la série transverse postérieure est de 12, iii- sur la série zigzag est de 9 *E. aquadulcis*.

7c – Le nombre d’écailles i- sur la ligne latérale est compris entre 75 et 82, ii- sur la zone prédorsale est compris entre 59 et 75, iii- sur la série transverse postérieure est compris entre 21 et 25, iv- sur la série zigzag est compris entre 19 et 20 *E. sandwicensis*.

8a – Le nombre d’écailles sur la série transverse antérieure est compris entre 13 et 22 *E. fusca*.

8b – Le nombre d’écailles sur la série transverse antérieure est compris entre 18 et 30 *E. cf. fusca*.

9a – Les mesures de %SDL, %AL, %BDM, %JL et de %PDL sont respectivement en fonction de la LS de 24-29%, 23-26%, 16-21%, 10-12% et 42-46%..... *E. cf. melanosoma sp2* – Océan Indien.

9b – Les mesures de %SDL, %AL, %BDM, %JL et %PDL sont respectivement de 28-37%, 27-36%, 20-28%, 12-14% et 46-47%..... *E. melanosoma* – Océan Pacifique.

10a* – Présence de dents sur le vomer. Le nombre d’écailles sur la zone prédorsale est de 41 *E. vomerodentata*.

10b – Absence de dents sur le vomer. Le nombre d’écailles sur la zone prédorsale est compris entre 37-42 *E. acanthopoma*.

10c – Absence de dents sur le vomer. Le nombre d’écailles sur la zone prédorsale est compris entre 30-37..... **11**

11a* – Les mesures de %SDL et %AL sont respectivement en fonction de la LS de 33% et 31%. Le nombre d’écailles sur la série transverse postérieure est de 16..... *E. pellegrini*.

11b– Les mesures de %SDL et %AL sont respectivement en fonction de la LS de 37-40% et 34-38%. Le nombre d’écailles sur la série transverse postérieure est compris entre 14 et 15..... *E. cf. pellegrini*.

Légende : * mesures effectuées sur le type unique.

Etude de la phylogéographie d'*E. fusca* et comparaison avec *E. acanthopoma*

Partie I.

Phylogéographie d'*Eleotris fusca* (Teleostei: Gobioidi: Eleotridae) dans l'Indo-Pacifique et présence d'une espèce cryptique dans l'océan Indien

Article soumis

Résumé – Les systèmes dulçaquicoles des milieux insulaires de l'Indo-Pacifique sont principalement colonisés par des espèces amphidromes. *Eleotris fusca* en est une et présente une large répartition dans cette zone ; son cycle de vie est caractérisé par une phase larvaire marine lui permettant de se disperser dans l'océan pour ensuite recruter dans des rivières situées dans des îles plus éloignées. Dans cette étude, nous avons évalué la structure des populations d'*E. fusca* au sein de son aire de distribution (de l'Ouest de l'océan Indien jusqu'en Polynésie Française, dans l'océan Pacifique). Dans un premier temps, nous avons analysé une section du gène mitochondrial *COI* à partir de 557 individus échantillonnés dans 23 îles afin de visualiser la structure des populations. La diversité haplotypique s'est révélée être importante ($0,458 \leq H_d \leq 1$), la diversité nucléotidique faible ($0,001 \leq \pi \leq 0,02$) et, deux groupes génétiquement distincts ont été mis en évidence, un dans l'océan Indien et l'autre dans l'océan Pacifique (F_{ST} moyenne de 0,901 ; moyenne de 5,2% de divergence génétique). A partir de ces résultats, des mitogénomes complets (mtDNA) ont été séquencés pour un certain nombre de ces individus et combinés avec le gène nucléaire de la Rhodopsine (*Rh*). Le même pattern génétique a été observé à travers les différents arbres phylogénétiques réalisés : deux groupes différents appartenant à l'océan Indien et à l'océan Pacifique (6,6% et 1,6% de divergence respectivement pour le mtDNA et le gène *Rh*) qui soutiennent la présence d'une différenciation génétique d'espèce. Ces résultats ont révélé la présence de deux espèces sœurs confondues jusqu'à présent sous le nom d'*Eleotris fusca*. L'une d'entre elles est une espèce cryptique et endémique de l'océan Indien tandis que l'autre est la vraie espèce *E. fusca* qui, néanmoins, garde son statut d'espèce à large répartition.

Phylogeography of *Eleotris fusca* (Teleostei: Gobioidae: Eleotridae) in the Indo-Pacific area reveals a cryptic species in the Indian Ocean

Article submitted

Abstract – Indo-Pacific insular freshwater systems are mainly dominated by amphidromous species. *Eleotris fusca* is a widespread one, its life cycle is characterised by a marine pelagic larval phase allowing the species to disperse in the ocean and then to recruit to remote island rivers. In the present study, we evaluated the population structure of *E. fusca* over its Indo-Pacific distribution range (Western Indian Ocean to French Polynesia, Pacific Ocean). At first, we analysed a section of mitochondrial *COI* of 557 individuals sampled from 23 islands to visualise the population structure. Haplotype diversity was high ($0.458 \leq H_d \leq 1$), nucleotide diversity was low ($0.001 \leq \pi \leq 0.02$), and two distinct genetic groups appeared, one in the Indian Ocean and the other in the Pacific Ocean (F_{ST} mean = 0.901; 5.2% average divergence). Given these results, complete mitogenomes (mtDNA) were sequenced for a part of individuals and combined with the nuclear Rhodopsin (Rh) gene. The two phylogenetic trees based on each analysis showed the same genetic pattern: two different groups belonging to the Indian and the Pacific oceans (6.6% and 1.6% of divergence for mtDNA and Rh gene respectively) which supported species level differentiation. These analyses revealed the presence of two sister species confounded until present under the name of *Eleotris fusca*. One of them is cryptic and endemic of the Indian Ocean and the other one is the real *E. fusca*, which keeps, nevertheless, its status of widespread species.

Introduction

The Indo-Pacific is the largest biogeographic region in the world, which includes unnumbered islands (Ekman 1953, Briggs 1974, Spalding et al. 2007). Insular freshwater systems are known to be perilous habitats because they are subject to extreme climatic and hydrological seasonal variations such as drought or cyclonic flood events. To colonise these systems species have developed a specific life cycle; the diadromy. Diadromous species spend a part of their life cycle in the sea and a part in freshwater systems. Among diadromous species, amphidromous ones mainly dominate these habitats and are the biggest contributors to the diversity of the freshwater communities (Nelson et al. 1997, Watson et al. 2007, Keith & Lord 2011, Keith et al. 2015). Amphidromous species spawn in freshwater; after hatching, larvae drift downstream to the sea where they undergo a planktonic phase. After this marine phase, individuals return to rivers to grow and reproduce (McDowall et al. 1994, Keith et al. 2008). The marine larval phase allows amphidromous species to disperse and to colonise new islands.

The colonization of insular rivers is influenced by numerous factors such as the species dispersal abilities, distances between islands, spatial and temporal characteristics of ocean currents and the presence of past or actual barriers (Lord et al. 2012, Pous et al. 2010, Feutry et al. 2013, Castelin et al. 2013, Taillebois et al. 2013). The Indo-Pacific area presents a lot of such physical barriers that are the consequence of past geologic activity and they played a role in the limitation of dispersal. These barriers emerged during various geologic periods; particularly in the Pleistocene, which is surely one of the most important period to explain the current species distribution in the Indo-Pacific (Tornabene et al. 2015, Ahti et al. 2016). The repeated lowering of sea level during Pleistocene glacial cycles created a nearly complete barrier between the Indian and Pacific oceans, the Indo-Pacific Barrier (IPB), and led to intraspecific genetic divergence in many taxa, and ultimately the formation of sister species pairs (Barber et al. 2006, Gaither & Rocha 2013, Ludt & Rocha 2015). Major phylogeographic breaks are observed between populations in the Pacific and the Indian oceans with this IPB (Briggs 1974, De Bruyn et al. 2004, De Bruyn & Mather 2007, Crandall et al. 2008) and other breaks are observed between some regions of the Central West Pacific with the Torres Strait (Mirams et al. 2011, Taillebois et al. 2013). The IPB is most often associated with the Sunda Shelf between Asia and Australia (Crandall et al. 2008, Gaither et al. 2011b, Lord et al. 2012). A lot of studies have investigated population genetic and phylogeographic patterns in the Indo-

Pacific region (Keyse et al. 2014), but mainly on marine organisms and they rarely encapsulate the entire geographic range of the species studied; few exist on diadromous species (Lord et al. 2012, Castelin et al. 2013, Taillebois et al. 2013).

In amphidromous fishes, the *Eleotris* genus (Eleotridae), with the most widespread species *Eleotris fusca* (Bloch & Schneider, 1801), is particularly interested to such a large-scale phylogeographic study. Indeed, this species is found in the Indo-Pacific area, from the Western Indian Ocean to New Caledonia, Vanuatu and French Polynesia (Keith et al. 2006, 2010, 2013; Mennesson et al. 2015). Its life cycle is characterised by a marine pelagic larval phase allowing the species to disperse in the ocean and then to recruit in remote island rivers (Mennesson et al. 2015). In these rivers, it is a common carnivorous species distributed primarily in freshwater (Maeda & Tachihara 2004, 2006). This species is euryhaline and is found in brackish waters, but mainly in the lower part of freshwater areas. It prefers to be close to the riverbank where the current is slow, or in the lentic zones (Keith et al. 2010). *E. fusca* undergoes pressures linked to the loss of the hydrological corridor and the habitat degradation. If the threats on this species were not clearly identify at the international scale due to a lack of investigations, the association of the habitat loss and post-larvae fisheries in the Reunion Island (Mascarene) lead the IUCN to classify *E. fusca* as “Endangered” on the red List of Endangered Species in France (IUCN France et al. 2013). Because of its role in the freshwater ecosystem and in local fisheries, it is important to understand the life cycle and the phylogeography of this species to implement conservation measures.

The aim of the present study was to explore the population structure of *E. fusca* within the Indo-Pacific region, using a phylogeographic approach. At first, *COI* barcoding of 557 individuals sampled from 23 islands was used to visualise the population structure. Given the results, complete mitogenomes were sequenced for a part of individuals and combined with the nuclear Rhodopsin (Rh) gene.

I. Material & methods

1. Sample collection

A total of 557 specimens of *E. fusca* were collected in the rivers of 23 islands included in the huge distribution range of the species and huddled in five biogeographic regions of the Indo-Pacific area as defined by Castelin et al. (2013) (Fig. 1; Table 1): i- the Central Pacific Ocean, CPO (Society Islands, Austral Islands, Marquesas and Cook Islands); ii- the Southwest Pacific Ocean, SWPO (Vanuatu, New Caledonia, Hoorn Islands, Fidji, Samoa and Solomon); the Northwest Pacific Ocean, NWPO (Indonesia, Philippines, Caroline Islands, Micronesia and Ryu-Kyu Islands); the Northwest Indian Ocean, NWIO (Seychelles Islands, Comoros Islands and Mayotte Island) and the Southwest Indian Ocean, SWIO (Mascarene Islands and Madagascar). Individuals were sampled using a DEKA 3000 electrofishing system (Gerätebau, Marsberg, Germany). All the fish were sampled in the lower part of the freshwater streams, as defined by Keith et al. (2013), at 5-50 m depth. Fish were put to sleep and killed using an overdose of clove essential oil (10%), then stored and preserved in 95% alcohol for molecular analysis.

2. DNA extraction and amplification

Pectoral fin tissue was used to extract total genomic DNA from the 557 individuals using the Macherey & Nagel NucleoSpin® Tissue kits following the manufacturer's instructions on an Eppendorf EpMotion 5075.

a. *COI* gene

Genetic diversity and patterns of genetic connectivity were investigated using a 585 pb fragment of mtDNA cytochrome oxidase (*COI*). Specific fish primers were used TelF1 and TelR1 (Table 2) to amplify the *COI* gene. DNA amplification was performed by PCR in a final 20 µL volume containing 5% DMSO, 1 µL of dNTP 6.6 µM, 0.15 µL of Qiagen Taq DNA polymerase, using 2 µL of the buffer provided by the manufacturer, and 0.4 µL of each of the two primers at 10 pM; 1.2 µL of DNA extract was added. After denaturation for 2 min at 94°C, the PCR was run for 55 cycles of (25s, 94°C; 25s, 54°C; 55s, 72°C) on a Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler. Successful PCRs were selected on ethidium-bromide stained agarose gels. Sanger sequencing was performed in both directions by a commercial company (Eurofins; <http://www.eurofins.fr>) using the same primers.



Figure 1: Map of the Indo-Pacific showing sampled localities

Table 1: Details of tissue samples of *Eleotris fusca* specimens. Samples size of each island (N) and abbreviated names of each analysed population. Specimens from Philippines and Micronesia were not used for the AMOVA because of their small sample size

Regions	Countries	Islands	N	Populations
Central Pacific Ocean (CPO)	Society Islands	Moorea	42	SOC
	Austral Islands	Rurutu	54	AUS
	–	Tubuai	2	
	Marquesas	Ua huka	4	MAR
	Cook Islands	Rarotonga	19	COO
Southwest Pacific Ocean (SWPO)	Vanuatu	Maewo	11	
	–	Santo	37	
	–	Malakula	1	VAN
	–	Epi	7	
	–	Gaua	8	
	New Caledonia	Grande Terre	68	NCA
	Hoorn Islands	Futuna	4	HOO
	Fidji	Taveuni	4	FID
	Samoa	Upolu	14	SAM
	Solomon	Choiseul	20	SOL
–	Kolobangara	98		
Northwest Pacific Ocean (NWPO)	Indonesia	Bali	17	I-BA
	–	Papua	33	I-PA
	Philippines	Panay	1	–
	Caroline Islands	Palau	3	CAR
	Micronesia	Pohnpei	2	–
	Ryū-Kyū Islands	Okinawa	27	RKI
Northwest Indian Ocean (NWIO)	Seychelles Island	Silhouette	2	–
	Comoros Islands	Anjouan	2	COM
	–	Moheli	11	
	Mayotte Island	Mayotte	36	MAY
Southwest Indian Ocean (SWIO)	Mascarene Islands	Réunion	25	MAS
	Madagascar	Madagascar	5	MAD

b. Complete mitogenome and *Rh* gene

The population structure observed from the mtDNA *COI* data was tested using the complete mitogenome (NGS), with a subset of 29 *E. fusca* individuals: 21 for the Pacific Ocean and 8 for the Indian Ocean, and 3 outgroups (*E. acanthopoma*, *E. melanosoma* and *E. bosetoi*), following

the protocol established by Hinsinger et al. (2015) and using specific fish primers listed in Table 2. Hinsinger et al. (2015) developed a specific framework for the sequencing and multiplexing of mitogenomes on NGS platforms following 3 steps: i- a universal long-range PCR-based amplification technique; ii- a two-level multiplexing approach and iii- a dedicated demultiplexing assembling script from an Ion Torrent sequencing platform. With this method, obtaining complete or almost complete mitogenome sequences is now easier and low cost. Moreover, having an extensive dataset for each specimen (*i.e.*, 13 coding genes, 22 tRNA, 2 rRNA and the control region; namely, around 17,000 pb) permits to easily compare with all the data available in GenBank and also to target the most variable genes in order to have the best precision of the genetic history for the species.

Table 2: List of the primers used in this study for short and long PCR

Gene	Primer name	5'-3' sequence	Publication
<i>COI</i>	Tel F1	TCGACTAATCAYAAAGAYATYGGCAC	Dettai et al., 2011
<i>COI</i>	Tel R1	ACTTCTGGGTGNCCAAARAATCARAA	Dettai et al., 2011
Complete mitogenome	12S-L1091R	AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT	Kocher et al., 1989
Complete mitogenome	MtH7061	GGGTTATGTGGCTGGCTTGAAAC	Hinsinger et al., 2015
Complete mitogenome	MtL5231	TAGATGGGAAGGCTTCGATCCTACA	Hinsinger et al., 2015
Complete mitogenome	MtH11944	CATAGCTTTTACTTGGATTTGCACCA	Hinsinger et al., 2015
Complete mitogenome	MtL11910	CAGCTCATCCATTGGTCTTAGGAAC	Hinsinger et al., 2015
Complete mitogenome	12S-H1478	TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT	Hinsinger et al., 2015
<i>Rh</i>	F193	CARTGGTGCTACCTSTGCGA	Chen et al., 2003
<i>Rh</i>	R1039	CGTGGTCYTTCCCKGAAGCG	Chen et al., 2003

We amplified the mitogenome with 3 overlapping fragments (primers used are in Table 2). A HotStart LongAmp® Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich MA) modified protocol was used. The 3 fragments amplification were performed by PCR in a final 18 µL volume including 5X LongAmp Taq Reaction Buffer, 0.4 ng/µL Bovine Serum Albumin, 3.5% DMSO, 300 nM of each primer, 300 µM of dNTPs, and 1 unit of LongAmp Taq polymerase. After an initial denaturation of 30 s at 94°C, the DNA was amplified through 45 cycles of 20s at 94°C, 30s at 62.5°C, and 15 min at 65°C, with a terminal elongation for 15min at 65°C (Hinsinger et al. 2015) on a Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler. Successful PCRs were selected on ethidium-bromide stained agarose gels.

The nuclear rhodopsin gene (*Rh*) was used to add support to the population structure observed from the mtDNA data. We used F193 and R1039 as primers (Table 2), DNA amplification, from 37 specimens, by PCR was the same as *COI* and then, PCR were added with complete mitogenomes following the protocol of Hinsinger et al. (2015).

3. *COI* analysis

For mtDNA *COI* gene (585 bp), data processing and sequence assembly were done in Geneious 9.0.5 (Kearse et al. 2012) and all sequences were aligned with Muscle Alignment (implemented in Geneious).

Arlequin v.3.11 (Excoffier et al. 2005) was used to measure the genetic diversity in the population of *E. fusca* in the Indo-Pacific area. Different indices, such as number of haplotypes (*h*), haplotype diversity (*Hd*) and mean nucleotide diversity (π) were calculated.

A median-joining network was built from the *COI* dataset using Network v.5 (Bandelt et al. 1999) with equal weight for variable. We applied a maximum parsimony algorithm and the criterion “frequency > 1” to simplify the complex branching pattern and to generate a network representing all the most parsimonious intraspecific phylogenies.

To study the partitioning of genetic variance within and among populations, analyses of molecular variance (AMOVA, Excoffier et al. 1992) were performed using Arlequin v.3.11. Samples were first partitioned into 18 countries (Table 3); Philippines, Micronesia and Seychelles samples weren't added to the analysis because of their small size. Secondly, to have a large view, samples were assembled into the 5 defined regions (Table 4).

To investigate broader-scale patterns of structuring, a hierarchical AMOVA was performed using at first, the 18 Indo-Pacific countries and secondly, the 5 regions (CPO, SWPO, NWPO, SWIO and NWIO) as populations (Table 5 & 6). Pairwise F_{ST} values were calculated between each pair of populations to assess to the genetic differentiation. Significance of *F*-statistics was calculated from 10,000 replicate analyses based on the samples drawn randomly and alpha value of 0.05. To test for isolation by distance, the Mantel test implemented in XLSTAT (1000 permutations) was performed between genetic (F_{ST}) and geographic distances (km).

The demographic history of *E. fusca* was analysed with Arlequin v.3.11 using the Fu's *F_s*-statistic (Fu 1997); genetic pattern expected under demographic expansion are indicated with significant negative values of Fu's *F_s*.

Table 3: Molecular diversity indices for mtDNA *COI* sequences for each analysed population. Sample size (N), haplotype diversity (Hd), number of haplotypes (h), nucleotide diversity (π), Fu's *F_s*-statistics. *F_s* values Significant (p -value ≤ 0.05) are in bold.

Regions	Countries	Population	N	Hd	h	π	<i>F_s</i>
Central Pacific Ocean (CPO)	Society Islands	SOC	42	0,558	5	0,001	-0,79
	Austral Islands	AUS	56	0,458	7	0,001	-4,18
	Marquesas	MAR	4	–	1	–	–
	Cook Islands	COO	19	0,725	6	0,002	-2,26
Southwest Pacific Ocean (SWPO)	Vanuatu	VAN	64		27	0,004	-22,84
	New Caledonia	NCA	68	0,914	28	0,004	-25,47
	Hoorn Islands	HOO	4	0,500	2	0,002	1,10
	Fidji	FID	4	1	4	0,004	-1,51
	Samoa	SAM	14	0,912	9	0,002	-3,77
	Solomon	SOL	118	0,864	51	0,020	-14,37
Northwest Pacific Ocean (NWPO)	Indonesia - Bali	I-BA	17	0,868	9	0,004	-3,46
	Indonesia - Papua	I-PA	33	0,934	11	0,004	-18,64
	Caroline Islands	CAR	3	0,667	2	0,001	0,20
	Ryū-Kyū Islands	RKI	27	0,915	18	0,004	-15,27
Northwest Indian Ocean (NWIO)	Comoros Islands	COM	13	0,897	8	0,003	-4,50
	Mayotte Island	MAY	36	0,844	18	0,006	-8,10
Southwest Indian Ocean (SWIO)	Mascarene Islands	MAS	25	0,760	9	0,010	1,17
	Madagascar	MAD	5	0,900	4	0,002	-1,65

Table 4: Molecular diversity indices for mtDNA *COI* sequences for each analysed population grouped into 5 regions. Sample size (N), haplotype diversity (Hd), number of haplotypes (h), nucleotide diversity (π), Fu's *F_s*-statistics. *F_s* values Significant (p -value ≤ 0.05) are in bold.

Regions	Population	N	Hd	h	π	<i>F_s</i>
Central Pacific Ocean	CPO	121	0,573	14	0,002	-7,11
Southwest Pacific Ocean	SWPO	271	0,886	87	0,011	-24,61
Northwest Pacific Ocean	NWPO	85	0,884	35	0,004	-27,15
Northwest Indian Ocean	NWIO	30	0,805	12	0,009	-0,84
Southwest Indian Ocean	SWIO	53	0,820	23	0,005	-14,97

Table 5: Pairwise F_{ST} values for the mtDNA *COI* haplotypes of the 18 populations (below diagonal) and associated p -values (above diagonal; significant p -values are indicated with the symbol “+”). Significant pairwise F_{ST} values are given bold (p -value ≤ 0.05).

	MAD	MAY	MAS	COM	I-BA	RKI	CAR	I-PA	VAN	NCA	FID	HOO	SAM	SOL	COO	AUS	SOC	MAR
MAD		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAY	-0.042		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAS	0.103	0.010		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
COM	0.039	-0.019	0.015		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I-BA	0.935	0.900	0.849	0.937		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
RKI	0.929	0.901	0.858	0.931	-0.020		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
CAR	0.963	0.892	0.816	0.952	0.043	-0.038		-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
I-PA	0.926	0.902	0.862	0.928	-0.004	0.001	-0.116		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
VAN	0.927	0.909	0.881	0.928	0.005	0.024	-0.149	0.000		-	-	-	-	-	+	+	+	+
NCA	0.932	0.913	0.887	0.933	0.010	0.023	-0.121	-0.009	0.002		-	-	-	+	+	+	+	+
FID	0.941	0.889	0.816	0.942	-0.061	-0.058	-0.055	-0.070	-0.043	-0.058		-	-	+	+	+	+	+
HOO	0.960	0.892	0.820	0.951	-0.001	-0.026	0.268	-0.009	0.008	0.031	0.000		-	-	+	+	+	+
SAM	0.928	0.894	0.838	0.932	-0.019	0.005	-0.065	0.008	0.007	0.023	-0.092	-0.032		-	+	+	+	+
SOL	0.705	0.728	0.683	0.716	-0.001	0.010	-0.144	0.013	0.027	0.028	-0.095	-0.084	-0.002		+	+	+	+
COO	0.968	0.920	0.881	0.963	0.736	0.704	0.823	0.688	0.673	0.697	0.763	0.808	0.712	0.293		+	+	+
AUS	0.982	0.948	0.930	0.978	0.836	0.802	0.900	0.785	0.748	0.765	0.869	0.891	0.826	0.364	0.048		+	+
SOC	0.974	0.937	0.913	0.970	0.779	0.746	0.845	0.729	0.700	0.721	0.804	0.833	0.763	0.324	-0.015	0.030		+
MAR	0.975	0.901	0.835	0.960	0.723	0.685	0.953	0.673	0.679	0.700	0.800	0.909	0.699	0.248	0.891	0.936	0.902	

Table 6: Pairwise F_{ST} values for the mtDNA *COI* haplotypes of the 5 biogeographic regions (below diagonal) and associated p -values (above diagonal; significant p -values are indicated with the symbol “+”). Significant pairwise F_{ST} values are given in bold (p -value ≤ 0.05).

	CPO	SWPO	NWPO	SWIO	NWIO
CPO		+	+	+	+
SWPO	0.460		-	+	+
NWPO	0.723	0.005		+	+
SWIO	0.936	0.794	0.895		-
NWIO	0.949	0.823	0.921	0.013	

4. Complete mtDNA and *Rh* gene analyses

For the complete mtDNA, the same data processing and sequence assembly were done as for mtDNA *COI* gene. In this present study, we decided to use the 13 protein-coding genes and not the complete mitogenome (11 546 bp vs. 16 510 bp) because the 22 tRNA, the 2 rRNA and the control region were not enough informative. A phylogenetic tree based on the thirteen concatenated genes was performed using Bayesian inference (MrBayes v.3.2; Ronquist et al. 2012). The best-fitting models of evolution were computed in PartitionFinder (Lanfear et al.

2012). The analysis was realised using the three-codon positions for each genes as partition (Table 7) and was run for 10 million generations, sampling every 200 generations with two independent runs to access convergence.

Table 7: Details of BIC models used for the three-codon positions for each gene

Gene	Length (bp)	Codon position	BIC Model
ND1	975	first	HKY + I
		second	HKY + I
		third	GTR + I +G
ND2	1047	first	GTR + I
		second	HKY + I
		third	GTR + I
COI	1563	first	K80 + I
		second	HKY + I
		third	GTR + I +G
COII	699	first	K80 + I
		second	HKY + I
		third	GTR + I +G
ATP8	168	first	HKY + I
		second	HKY + I
		third	GTR + I +G
ATP6	684	first	HKY + I
		second	HKY + I
		third	GTR + I +G
COIII	786	first	K80 + I
		second	HKY + I
		third	GTR + I +G
ND3	351	first	HKY + I
		second	HKY + I
		third	GTR + I +G
ND4L	297	first	HKY + I
		second	HKY + I
		third	GTR + I +G
ND4	1386	first	HKY + I
		second	HKY + I
		third	GTR + I +G
ND5	1839	first	HKY + I
		second	HKY + I
		third	GTR + I +G
ND6	522	first	GTR + G
		second	HKY + I + G
		third	HKY + I + G
Cytb	1197	first	HKY + I
		second	HKY + I
		third	GTR + I +G

A phylogenetic tree based on the *Rh* dataset (803 bp) was also performed using Bayesian inference (MrBayes v.3.2; Ronquist et al. 2012). Three models computed in PartitionFinder (Lanfear et al. 2012) (1st position, JC model; 2nd position, HKY model; 3rd position, HKY + I model) were run for 10 million generations, sampling every 100 generations with two independent runs to assess convergence.

For each analysis, run convergence was checked using TRACER v.1.6.0 (Rambaut & Drummond 2007). Trees were summarised using the 50% majority rule method after discarding the first 25% of the sample as burnin and visualised using FigTree v.1.4.2 (Rambaut 2007). And the percentage of differences between sequences and the number of bases, which are not identical were calculated on Geneious 9.0.5 (Table 8 & 9).

For each bayesian trees, three other species of *Eleotris* were used as outgroups: *E. acanthopoma* (Bleeker, 1853), *E. melanosoma* (Bleeker, 1853) and *E. bosetoi* (Mennesson et al. 2016).

Table 8: The percentage of differences between sequences (above diagonal) and the number of bases (below diagonal), which are not identical for the complete mtDNA. Differences between *E.cf. fusca* and *E. fusca* are highlighted in bold type.

	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							
1 <i>E. acanthopoma_24_Seychelles</i>	16.2	16.3	16.3	16.3	16.2	16.3	16.1	16.1	16.1	16.2	16.0	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.8	15.9	15.9	15.8	15.9	15.8	15.9	16.5					
2 <i>E. cf. fusca_74_Aniouan</i>	0.6	0.7	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	0.6	0.5	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6		
3 <i>E. cf. fusca_75_Aniouan</i>	73	59	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
4 <i>E. cf. fusca_70_Madagascar</i>	77	59	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
5 <i>E. cf. fusca_78_Moheli</i>	61	46	41	41	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
6 <i>E. cf. fusca_22_Seychelles</i>	65	46	53	36	36	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
7 <i>E. cf. fusca_103_3_Moheli</i>	66	49	54	41	21	69	769	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	
8 <i>E. cf. fusca_11763_Moorea</i>	770	769	771	773	773	771	771	769	769	0.2	0.3	0.4	1.1	1.4	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	
9 <i>E. cf. fusca_16001_Rarotonga</i>	772	771	773	773	773	773	773	771	25	0.3	0.4	1.1	1.4	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	
10 <i>E. cf. fusca_11780_Rurutu</i>	768	768	768	768	768	768	768	766	38	0.3	1	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	
11 <i>E. cf. fusca_16002_Rarotonga</i>	767	766	766	768	768	768	764	766	41	34	0.3	1	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	
12 <i>E. cf. fusca_16122_NC</i>	762	759	762	761	760	760	760	758	121	117	114	126	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	
13 <i>E. cf. fusca_11823_Reunion</i>	759	758	759	758	758	758	758	758	157	162	163	101	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
14 <i>E. cf. fusca_6_Papua</i>	750	747	750	751	749	751	749	751	149	153	157	158	68	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
15 <i>E. cf. fusca_16118_Vanuatu</i>	758	758	758	761	762	760	762	762	151	155	160	98	71	29	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
16 <i>E. cf. fusca_13956_Okinawa</i>	751	756	752	754	752	754	752	754	149	153	159	160	99	74	34	33	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
17 <i>E. cf. fusca_16077_Samoa</i>	755	752	755	755	756	754	756	756	154	158	164	165	100	73	35	37	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
18 <i>E. cf. fusca_104_NC</i>	751	752	751	752	750	752	752	752	153	157	163	164	101	76	36	35	26	27	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
19 <i>E. cf. fusca_16117_Vanuatu</i>	747	744	744	747	748	746	748	748	155	159	165	166	103	74	34	33	34	25	20	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	
20 <i>E. cf. fusca_115_Futuna</i>	751	752	751	752	750	752	752	752	155	159	165	164	104	79	39	38	31	42	37	38	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
21 <i>E. cf. fusca_11825_Reunion</i>	752	749	754	753	751	753	751	753	146	152	156	161	96	73	31	31	34	35	33	38	28	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
22 <i>E. cf. fusca_L-159_Vanuatu</i>	752	749	754	753	751	753	751	753	156	160	167	165	107	85	61	55	57	60	59	61	62	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	
23 <i>E. cf. fusca_28_Samoa</i>	755	752	757	756	756	754	756	756	146	156	157	96	69	47	45	45	46	49	47	52	52	46	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	
24 <i>E. cf. fusca_9540_Vanuatu</i>	755	752	757	756	756	754	756	756	145	155	156	99	72	48	46	46	50	49	52	50	55	47	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	
25 <i>E. cf. fusca_16082_Samoa</i>	759	755	760	744	744	744	744	744	144	148	149	105	106	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	
26 <i>E. cf. fusca_4_Papua</i>	741	744	744	744	744	744	744	744	140	144	148	149	105	106	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	
27 <i>E. cf. fusca_103_NC</i>	758	758	758	755	758	755	756	756	145	149	153	122	119	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	109	
28 <i>E. cf. fusca_132_Okinawa</i>	737	738	741	738	737	738	737	738	155	161	163	164	123	121	122	127	123	126	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	
29 <i>E. cf. fusca_13955_Okinawa</i>	737	738	741	738	737	738	737	738	150	154	160	161	126	121	115	113	118	115	114	114	114	114	114	114	114	114	114	114	114	114	114	114	114	114	114	114	114	114	
30 <i>E. cf. fusca_16079_Samoa</i>	740	740	743	742	737	740	740	740	149	153	159	120	117	109	109	109	109	110	111	113	114	112	110	116	106	109	96	88	100	84	100	84	100	84	100	84	100		
31 <i>E. bosei_13528_Salomon</i>	1394	1382	1384	1383	1373	1384	1419	1421	1415	1424	1408	1410	1404	1407	1407	1407	1407	1408	1403	1399	1406	1409	1411	1412	1413	1410	1408	1402	1400	1396	1399	1399	1399	1399	1399	1399			
32 <i>E. melanosoma_12487_Salomon</i>	1508	1504	1507	1503	1496	1499	1499	1500	1503	1495	1496	1487	1464	1470	1469	1469	1469	1468	1467	1465	1472	1474	1471	1473	1471	1475	1470	1472	1471	1466	1464	1464	1466	1464	1466	1464			

II. Results

1. Gene diversity for mtDNA *COI*

A total of 585 bp of mtDNA *COI* from 557 individuals were obtained from *E. fusca* (plus the two outgroups) and deposited in GenBank. The number of individuals sequenced (N), haplotypes diversity (Hd), number of haplotypes (h) and nucleotides diversity (π) for each country and each region are provided in Table 3 and 4.

Haplotypes diversity was high in the 18 countries ($0.458 \leq Hd \leq 1$) (Table 3) and nucleotide diversity was low ($0.001 \leq \pi \leq 0.02$). Same results were observed when the analysis was performed with the regions (Table 4).

2. Phylogeographic analysis for mtDNA *COI*

The haplotype network from mtDNA *COI* showed two main distinct genetic groups separated by 25 nucleotide substitutions (5.2% average divergence) plus 3 median vectors (Fig. 2) which, reveals the presence of a cryptic species. The individuals sampled in the Indian Ocean (NWIO and SWIO) represent the first group, which exhibited a star-like topology with no obvious geographic patterns. The second is composed of those sampled in the Pacific Ocean (NWPO, SWPO and CPO) and a geographical structuration is obvious; the NWPO and SWPO are pooled in a sub-group, and the CPO is in fringe of it. Two individuals sampled in the Indian Ocean (both from Reunion Island) and one from Moorea (French Polynesia) were included in the NWPO-SWPO sub-group. One specimen from Mayotte Island and one from Vanuatu were found in the CPO sub-group, Marquesas formed an isolated group and shared no haplotypes with any other location.

The observation of significant F_{ST} values ($p \leq 0.05$) revealed different genetic structures among the 18 countries (Table 5). Within the Indian Ocean countries, a very low significant genetic differentiation ($F_{ST} = 0.015$) is showed between the Comoros and Mascarene Islands (Anjouan, Moheli vs. Reunion Island). The comparison of Indian and Pacific oceans countries indicated a strong and significant genetic structure (F_{ST} mean = 0.901; 5.2% average divergence). Within the Pacific Ocean countries, we observed that few F_{ST} were significant between NWPO and SWPO countries, those that were significant presented a very low genetic differentiation (F_{ST} VAN – RKI = 0.024; F_{ST} NCA – RKI = 0.023; F_{ST} VAN – SOL = 0.027; F_{ST} NCA – SOL = 0.028). A high level of population structure between CPO and the sub-group

NWPO-SWPO was found (F_{ST} mean = 0.725; 0.5% average divergence); however, this structuration level was less high when we compared CPO to Solomon Islands (F_{ST} mean = 0.307). Within the CPO, Marquesas presented high genetic structure (F_{ST} mean = 0.910; 1.4% average divergence) with the other CPO islands (*i.e.*, Rarotonga [Cook Islands], Rurutu, Tubuai and Moorea [French Polynesia]).

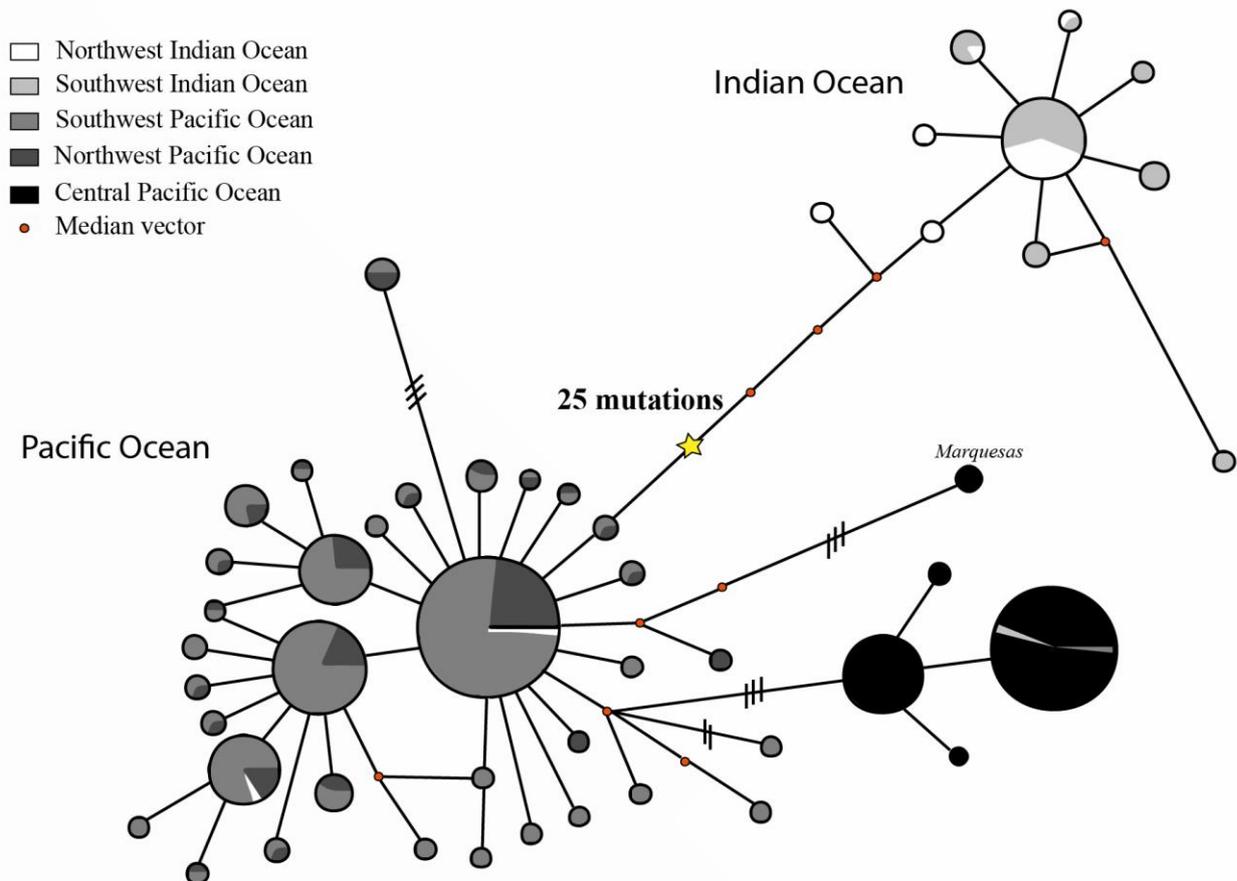


Figure 2: Median-joining network for *E. fusca* from the mtDNA *COI*. Circles represent individual haplotypes and are color-coded on geographical locations. Circles are sized proportionally to the haplotype frequencies. All haplotypes are separated by one mutational step; cross-bars on branches indicate when mutation steps are higher than one nucleotide. Each little red circle represents a median vector.

When countries were grouped by region, we still observe a strong significant genetic structure between the Indian and Pacific Ocean ($0.794 \leq F_{ST} \leq 0.949$) (Table 6) and that CPO region is less genetically differentiated from SWPO ($F_{ST} = 0.461$) than NWPO ($F_{ST} = 0.723$).

The majority of Fu's F_s values were significantly negative (Table 3) that could be evidence for recent demographic expansion for some of the 18 countries. For the 5 regions of the Indo-Pacific, all Fu's F_s values were significantly negative except for the NWIO (Table 4).

The Mantel test showed a positive and significant correlation between genetic and geographic distances when we focused on the 5 regions ($r = 0.83$; p -value = 0.002); and geography explained 68% of the genetic structuration. However, when the test is based on the 18 countries ($r = 0.36$; p -value $< 10^{-4}$) geography explained only 13% of the genetic structuration among populations. This fluctuation of the correlation suggests that i- the high number and spatial proximity of Pacific localities (14 countries vs. 4 in the Indian Ocean) might decrease the signal of the correlation; ii- the gene flow is affected by others factors than the geographic distance.

3. Phylogenetic analyses: complete mtDNA and *Rh* gene

32 complete mtDNA were obtained and deposited in GenBank. The phylogenetic tree-based on the 13 concatenated coding genes (11546 bp) show the same topology of the tree obtained only with the *COI* gene and, supported species-level differentiation in the clade A (Fig. 3). Indeed, we observed two sub-clades separated by a divergence of 6.6% between sequences namely 756 nucleotides of difference (Table 8). The sub-clade A_2 is composed with specimens of one cryptic species sampled only in the Indian Ocean, here named *E. cf. fusca*, and the other one (A_1) is composed with Pacific Ocean specimens plus two sampled in Reunion Island, which belonged to the true *E. fusca* species (type locality CPO, French Polynesia). These two specimens were the two of the three ones we observed in the *COI* haplotype network (Fig. 2). When we looked at the intra-population variation, the two species presented low divergence (0.47% and 0.89% between sequences and 52 and 102 nucleotides of difference for *E. cf. fusca* and *E. fusca* respectively). Within the CPO group (Moorea, Rarotonga and Rurutu specimens) the divergence between sequences is lower (difference of 36 bases and 0.3%) than when they were compared to the NWPO and SWPO groups (154 bases and 1.3%). As seen in the *COI* haplotype network, the CPO islands appear to be a little bit different from the others Pacific Ocean islands. The three outgroups (clade B and C), *E. melanosoma*, *E. bosetoi* and *E. acanthopoma* presented a high divergence with the clade A_1 and A_2 , the difference of number

bases varied around 1383 to 1872 namely 12% to 16.3% of divergence between sequences (Table 8).

The phylogenetic tree based on the *Rh* dataset is similar to that of complete mtDNA. It presented two distinct clades, the clade A included all the specimens sampled in the Pacific Ocean plus two from Reunion Island (the same as the haplotype network and the complete mtDNA tree); the clade B included those sampled in the Indian Ocean, *i.e.* *E. cf. fusca* and clade C consisted of the outgroups (Fig. 4). The intra-population variation within each species is about one or two nucleotides of difference between sequences namely 0.1% or 0.2% of divergence for *E. cf. fusca* and *E. fusca* respectively (Table 9). When we compared the two species, 13 nucleotides are different and we observed 1.6% of divergence.

III. Discussion

1. Pelagic larval duration *vs.* phylogeographic results

Menesson et al. (2015) showed that *E. fusca* presented a high variability in the pelagic larval duration (PLD) according to the sampling localities, which illustrates a high plasticity in the PLD of the species. Mean PLDs were similar between the Pacific (mean \pm SD: 93.0 ± 18.4 days) and the Indian oceans (91.4 ± 31.5 days). In the Pacific Ocean, the PLD was similar in Vanuatu (mean \pm SD: 90 ± 19.2 days) and French Polynesia (96.2 ± 17.5 days) whereas a significant difference emerged in the Indian Ocean between Mayotte (63.3 ± 11 days) and Reunion Island (114.8 ± 21.8 days). These authors suggested that their results could be due to a genetic differentiation between populations inducing a variable capacity to disperse far away. Our phylogeographic study was an opportunity to compare the PLD obtained by Menesson et al. (2015) and the genetic structuration of *E. fusca* in the Indo-Pacific. Our present study shows a significant genetic structure across the Indo-Pacific; Indian and Pacific oceans represent two structured lineages, but no genetic break was observed in the Indian Ocean (although differences in the PLD between Mayotte and Reunion were observed by Menesson et al. (2015)), and two potential populations might exist in the Pacific Ocean (NWPO-SWPO and CPO, Polynesia). So there is no link between the PLD observed by Menesson et al. (2015) and the genetic break observed in our study.

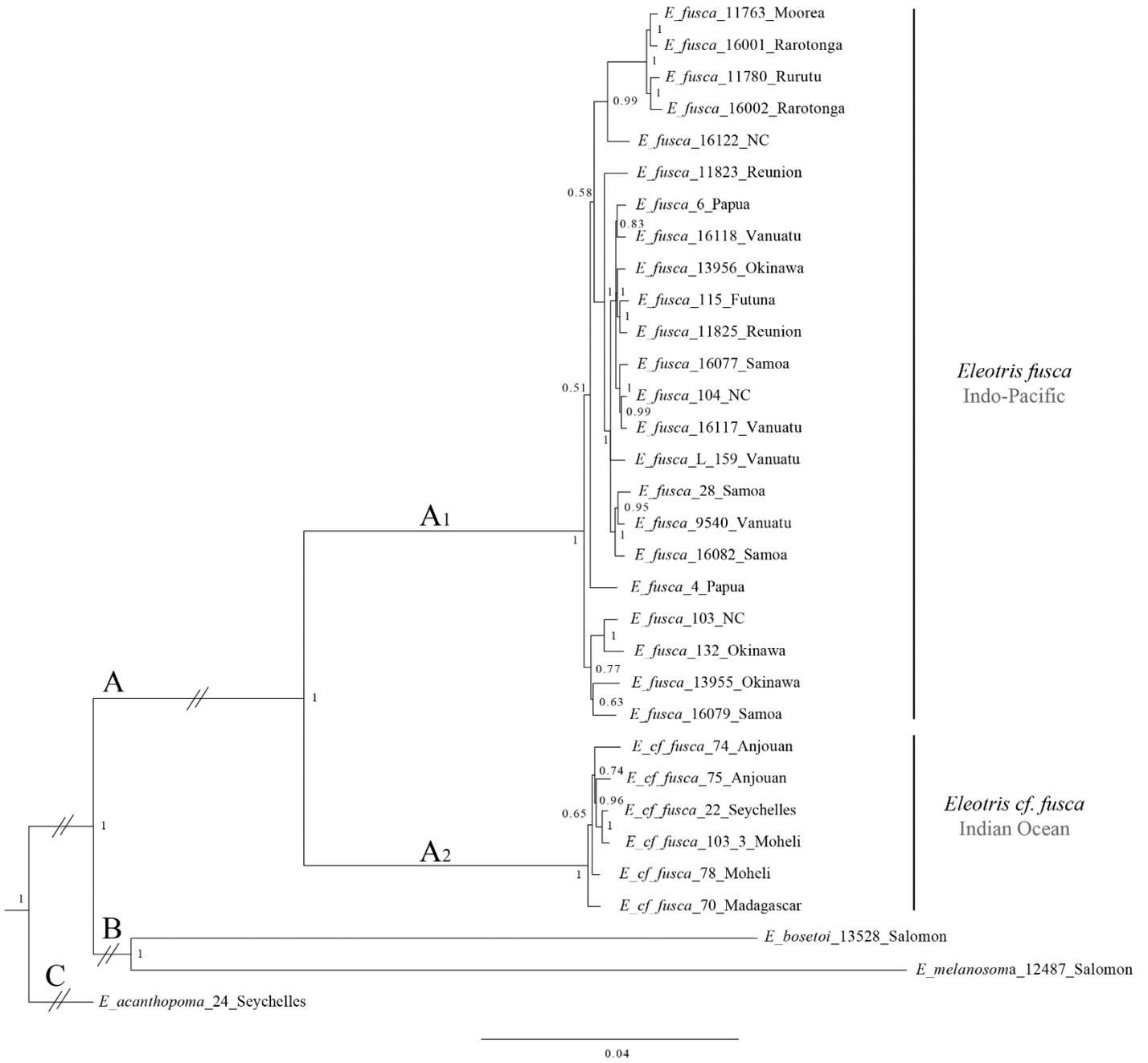


Figure 3: Bayesian tree of the complete mtDNA for sequences specimens of *E. fusca*. Numbers on the nodes represent posterior probabilities.

2. *E. cf. fusca*, an endemic cryptic species of Indian Ocean

Our mtDNA *COI* analysis reveals two distinct genetic groups in the Indo-Pacific area (separated by at least 25 nucleotide substitutions *i.e.*, 5.2 % of divergence), one group corresponding to the Indian Ocean and the other to the Pacific Ocean. This kind of result was found in several marine and diadromous widespread species as *Nerita albicilla* Linnaeus, 1758 (Crandall et al. 2008) a gastropod and, 3 fish species, *Kuhlia rupestris* Lacepède, 1802 (Feutry et al. 2013), *Sicyopterus lagocephalus* Pallas, 1770 (Lord et al. 2012) and *Cephalopholis argus* Schneider, 1801 (Gaither et al. 2011a). However, in these studies, according to their results and percentages of divergence, the authors concluded to the structuration in two different populations, one in the Indian Ocean and the other in the Pacific Ocean. In our study, our results with the complete mtDNA and the *Rh* gene (same genetic pattern: 756 and 13 nucleotide substitutions namely 6.6% and 1.6% of divergence, respectively) supported species level differentiation. One lineage is composed by the real *E. fusca* (specimens of Pacific Ocean and two sampled in Reunion Island) and the other lineage is though composed by a cryptic species present only in the Indian Ocean and named here *E. cf. fusca*.

Few authors working on widespread Pacific species found also cryptic species such as within the fish *Acanthurus nigroris* Valenciennes, 1835 (Dibattista et al. 2011) (25 mutations and 4.1% of divergence) between Hawaii specimens and the remaining of the Pacific Ocean or, within the shrimp *Parupeneus multifasciatus* Quoy & Gaimard, 1825 (Szabó et al. 2014) (25 nucleotide substitutions ($F_{ST} = 0.9$) and a genetic difference of 4.12%) separating the specimens from Marquesas Islands from the other Pacific islands.

The star-like pattern of the Indian Ocean group in the *COI* haplotype network (Fig. 2) is typically associated to a scenario of past colonisation events followed by demographic expansions, which could be due to past bottlenecks after population depletions caused by climatic events (*e.g.* during Pleistocene with the repeated lowering sea levels). This star-like pattern has been observed in some studies with *Lutjanus fulvus* Forster, 1801, a reef fish, (Gaither et al. 2010), or *S. lagocephalus* (Lord et al. 2012) or *Sicyopus zosterophorum* Bleeker, 1856 (Taillebois et al. 2013), two amphidromous fishes. Moreover, the very low significant genetic differentiation ($F_{ST} = 0.015$) observed between the Comoros and Mascarene Islands (Anjouan, Moheli *vs.* Reunion Island) is consistent with this scenario, which suggests the existence of continuous flows between all the Indian Ocean islands.

3. *E. fusca*, a widespread species in the Indo-Pacific

In the Pacific group, the CPO populations (Polynesia) are genetically differentiated from the NWPO and the SWPO populations (see *COI* and mtDNA results). Castelin et al. (2013) observed the same isolation of the CPO for *Macrobrachium lar* Fabricius, 1798, a widespread and amphidromous crustacean species, as Lord et al. (2012) and Coleman et al. (2016) for *S. lagocephalus* (an amphidromous goby) and *Pygoplites diacanthus* Boddaert, 1772 (a reef fish), respectively. This isolation of the CPO with the remaining of the Pacific might be explained by the use of different currents by the post-larvae when they disperse in the ocean. Indeed, the South Equatorial Current (SEC), the South Equatorial Counter Current (SECC) and the Marquesas Counter Current (MCC) disperse the organisms in different ways; the SEC might disperse sporadically post-larvae from the CPO to the other Pacific Islands and the SECC and the MCC might keep them in the CPO. Another fact that could induce the differentiation between NWPO/SWPO and CPO is the high ocean depth between Samoa and French Polynesia which could act as a barrier for post-larvae.

Another interesting result is the isolation of the Marquesas Islands within the CPO and the fact that they present less differentiation from the NWPO and SWPO than from the CPO (F_{ST} of 0.707 vs. 0.910). The biogeographic genetic break for Marquesas Islands has commonly been observed for reef fishes such as *Acanthurus triostegus* Linnaeus, 1758 (Planes 1993), *Lutjanus kasmira* Forsskål, 1775 and *L. fulvus* Forster, 1801 (Gaither et al. 2010) or *Parupeneus multifasciatus* (Szabó et al. 2014). Planes (1993) explained that the opposition between the MCC and the SEC may constitute a barrier for larvae and may explain the strong divergence of the Marquesas population. Ocean currents may have a strong influence on the population genetic flow (Gaither et al. 2010), which depends on the post-larvae behaviour (Keith 2003).

Within the Pacific group, two or three specimens, of the real *E. fusca* sampled in the Indian Ocean, are observed according to the gene used (Fig. 2, 3, 4). This shows that there is a low gene flow between the two oceans. The Indo-Pacific Barrier (IPB) with the lowering and rising sea levels during Pleistocene (Briggs 1974, Voris 2000) played probably a great role in the ability of *Eleotris* post-larvae to disperse. Moreover, the larval dispersal could be subject to numerous other physical barriers (Grant & Bowen, 1998) such as the depth, the salinity variation, the gyres and the current patterns (Borkin 1991, Hare & Cowen 1996, Murphy & Cowan 2007). Our results indicate that post-larvae might pass or have been passing from the Pacific Ocean to the Indian Ocean, but very sporadically with the SEC (Fig. 2, 3, 4). On the

contrary, the post-larval dispersion from the Indian Ocean to the Pacific Ocean was probably not possible, the SEC which links the two oceans is one-way from Pacific to Indian Ocean and, we have no specimens sampled in the Pacific Ocean showing an Indian Ocean haplotype. This type of results with a more or less slight gene flow has been found in other amphidromous species as *S. lagocephalus* (Lord et al. 2012), *M. lar* (Castelin et al. 2013) and, *Neritina stumpffi* Boettger, 1890 (Abdou et al. 2016). These gene flows are always from the Pacific Ocean to the Indian Ocean. A study on a reef fish species, *P. diacanthus* (Coleman et al. 2016) showed the same results when prospecting Christmas Island (eastern Indian Ocean, close to Indonesia) and Diego Garcia (in the middle of the Indian Ocean). The authors demonstrated that these two islands are keys areas for the stepping-stone model of dispersal for *P. diacanthus* as they shared both Pacific and Indian haplotypes. For this species, the IPB seems to be not the main barrier to dispersal.

Conclusion

The use of mtDNA *COI*, complete mtDNA and *Rh* gene revealed the presence of two sister species confounded under the name of *Eleotris fusca*. One of them is cryptic and endemic of the Indian Ocean and is called here *E. cf. fusca* and the other one is *E. fusca*, which keeps its status of a widespread species.

As it is difficult to distinguish morphologically one species from the other, another study has been done to find morpho-meristic characters to characterise each species and to give a name to *E. cf. fusca* (Menesson et al. *submitted*) (Chapitre 7).

As *E. fusca* was classified as “Endangered” on the red List of Endangered Species in France (Reunion Island) (IUCN France et al. 2013), our results show that this status should be revised as it included in fact two species. We hope that our study will help to implement conservation and management measures, such as life traits studies, to protect the endemic species, *E. cf. fusca*, in the Indian Ocean and also the widespread one, *E. fusca*, which seems rare in this ocean.

Conclusion sur la Partie I concernant la phylogéographie de l'espèce *E. fusca*

Les analyses moléculaires basées sur i- le gène partiel du *COI*, ii- le mitogénome complet (mtDNA) et le gène nucléaire *Rh*, révèlent la présence de deux espèces sœurs confondues sous le nom d'*Eleotris fusca*. L'une est cryptique et endémique de l'océan Indien et est nommée *E. cf. fusca* tandis que l'autre est *E. fusca* et garde son statut d'espèce à large répartition.

Cependant, dans le chapitre 2, traitant de la taxonomie du genre *Eleotris*, nous n'avions pas noté, de prime abord, la présence de deux entités sous le nom d'*E. fusca*. C'est pourquoi, dans le chapitre suivant (Chapitre 6) nous nous intéresserons de plus près à ces deux espèces afin d'approfondir les critères qui nous permettraient de les différencier mais aussi de donner un nom à l'espèce cryptique *E. cf. fusca*, et ce en analysant tous les synonymes existants qui pourraient s'y référer.

Les résultats de cette étude sont très importants en terme de conservation et de gestion pour ces deux espèces dans leurs milieux naturels. En effet, en 2013, *E. fusca* était classée « en danger » sur la liste rouge des espèces de France par l'IUCN sur l'île de La Réunion. Or, nous avons vu que, parmi tous les spécimens échantillonnés dans l'océan Indien, très peu sont des *E. fusca* ; ainsi une remise à niveau des connaissances s'impose afin de revoir le statut pour *E. fusca* et d'évaluer le statut pour *E. cf. fusca*.

Avant de statuer sur le nom d'*E. cf. fusca*, nous avons comparé la phylogéographie d'*E. fusca* à une autre espèce à large répartition, *E. acanthopoma*.

Partie II.

Comparaison de la phylogéographie de deux espèces à large répartition dans l'Indo-Pacifique : *E. fusca* et *E. acanthopoma*

Nous venons de voir que la répartition d'*E. fusca* dans la zone Indo-Pacifique n'est pas homogène, cette espèce étant beaucoup plus présente dans l'océan Pacifique que dans l'océan Indien. Cette hétérogénéité semble fortement être liée à un ou plusieurs événement(s) géologique(s) passé(s) telle que la répétition de la modification du niveau marin durant le Pléistocène. Cependant, nous avons observé des différences de population dans l'océan Pacifique entre les îles du Centre (CPO) et les autres îles (NWPO & SWPO), ce qui semble indiquer que la répartition des populations, dans l'Ouest de l'océan Pacifique, serait influencée par les courants et contrecourants voire même par les fosses océaniques de Kermadec et de Tonga qui limiteraient la dispersion larvaire à une zone englobant la Polynésie (*i.e.*, les îles Cook (Rarotonga) et la Polynésie Française).

Cependant, toutes les espèces amphidromes ne semblent pas présenter la même phylogéographie bien qu'elles aient la même aire de répartition. Nous avons comparé la phylogéographie d'*E. acanthopoma* (espèce largement répartie dans l'Indo-Pacifique) avec celle d'*E. fusca*, pour voir si ces deux espèces se dispersent de la même façon (*i.e.*, comparer leur flux de gènes au sein de l'Indo-Pacifique). Et par conséquent, voir s'il existe un pattern de dispersion commun aux *Eleotris* à large répartition.

I. Matériel & Méthodes

1. Jeu de données pour *E. fusca*

Ici, nous utiliserons le même jeu de données que celui présenté dans la 1^{ère} partie de ce chapitre.

2. Jeu de données pour *E. acanthopoma*

Exactement le même protocole a été utilisé pour réaliser le jeu de données moléculaire pour *E. acanthopoma* (cf. article précédent concernant le « *COI* gene »). Pour ce faire, nous disposons de 108 individus collectés sur 12 îles (Tableau 10).

Tableau 10 : Détail des individus d'*E. acanthopoma* échantillonnés dans l'Indo-Pacifique. N : le nombre d'échantillons par île.

Régions	Pays	Îles	N
Centre de l'Océan Pacifique (CPO)	Îles de la Société	Moorea	56
	Îles Cook	Rarotonga	1
Sud-Ouest de l'Océan Pacifique (SWPO)	Vanuatu	Gaua	8
	Salomon	Kolobangara	8
Nord-Ouest de l'Océan Pacifique (NWPO)	Indonésie	Bali	2
	–	Java	6
	–	Papua	1
	Micronésie	Pohnpei	1
Nord-Ouest de l'Océan Indien (NWIO)	Seychelles	Silhouette	8
	Comores	<i>non renseigné</i>	4
	Mayotte	Mayotte	10
Sud-Ouest de l'Océan Indien (SWIO)	Mascareignes	Réunion	2
	–	Maurice	1

Pour les 108 spécimens, nous avons séquencé le gène mitochondrial partiel *COI* soit 585 pb. Ces séquences ont été traitées et assemblées à l'aide du logiciel Geneious 9.0.5 puis alignées avec Muscle Alignment (inclus dans le logiciel).

Dans un premier temps, nous avons réalisé un réseau d'haplotypes avec le logiciel Network v.5 (Median Joining et maximum de parcimonie) (Bandelt et al. 1999), car ce type de réseau reflète mieux la structure du réseau généalogique au sein d'une espèce que les arbres phylogénétiques (Excoffier & Smouse 1994, Bandelt et al. 1999). De plus, les réseaux d'haplotypes permettent de bien visualiser les relations généalogiques entre les différents

haplotypes et leur distribution géographique. Avec le logiciel *DNAsp* v5.1 (Librado & Rozas 2009), nous avons pu calculer le nombre d'haplotypes ($h=43$) et la diversité haplotypique ($Hd=0,9107$).

Dans un second temps, nous avons construit un arbre phylogénétique par inférence bayésienne avec le logiciel MrBayes v.3.2 (Ronquist et al. 2012). Les 3 modèles adaptés aux trois positions de codons ont été obtenus avec PartitionFinder (Lanfear et al. 2012) : 1^{ère} position, le modèle K80 + I ; 2^{ème} position, le modèle F81 et ; 3^{ème} position, le modèle HKY. L'arbre phylogénétique est réalisé à partir de 2 analyses de 10 millions de générations chacune, avec un échantillonnage des arbres tous les 200 générations. La convergence des 2 analyses est vérifiée avec le logiciel TRACER v.1.6.0 (Rambaut & Drummond 2007). Les arbres sont synthétisés en appliquant la méthode du consensus majoritaire à 50% après avoir supprimé les 25 premiers pourcents des arbres obtenus (burnin à 25%). L'arbre obtenu est visualisé avec le logiciel FigTree v.1.4.2 (Rambaut 2007) et nous avons utilisé comme groupe externe *E. fusca* (Bloch & Schneider, 1801), *E. melanosoma* (Bleeker, 1853) et *E. bosetoi* (Mennesson et al. 2016). Les pourcentages de différence entre les différents clades ont été calculés avec Geneious 9.0.5.

II. Résultats & Discussion

Afin de mieux comparer la répartition phylogéographique des deux espèces, nous n'avons conservé dans le réseau d'haplotype d'*E. fusca*, que ce qui concerne cette espèce (suppression des données de l'espèce sœur *E. cf. fusca*) (Fig. 5).

Comme nous l'avons vu précédemment, la répartition d'*E. fusca* n'est pas homogène dans l'Indo-Pacifique puisqu'il y a peu de spécimens dans l'océan Indien et plusieurs populations dans l'océan Pacifique. A savoir, une population composée des îles du Nord-Ouest et du Sud-Ouest (NWPO & SWPO) et une seconde composée des îles de la Polynésie (îles Cook et Polynésie Française) (CPO) et qui semble même montrer un isolement des îles Marquises par rapport à ces dernières (mais non constatée dans l'arbre phylogénétique).

- Northwest Indian Ocean
- ◻ Southwest Indian Ocean
- ◻ Southwest Pacific Ocean
- ◻ Northwest Pacific Ocean
- ◼ Central Pacific Ocean
- Median vector

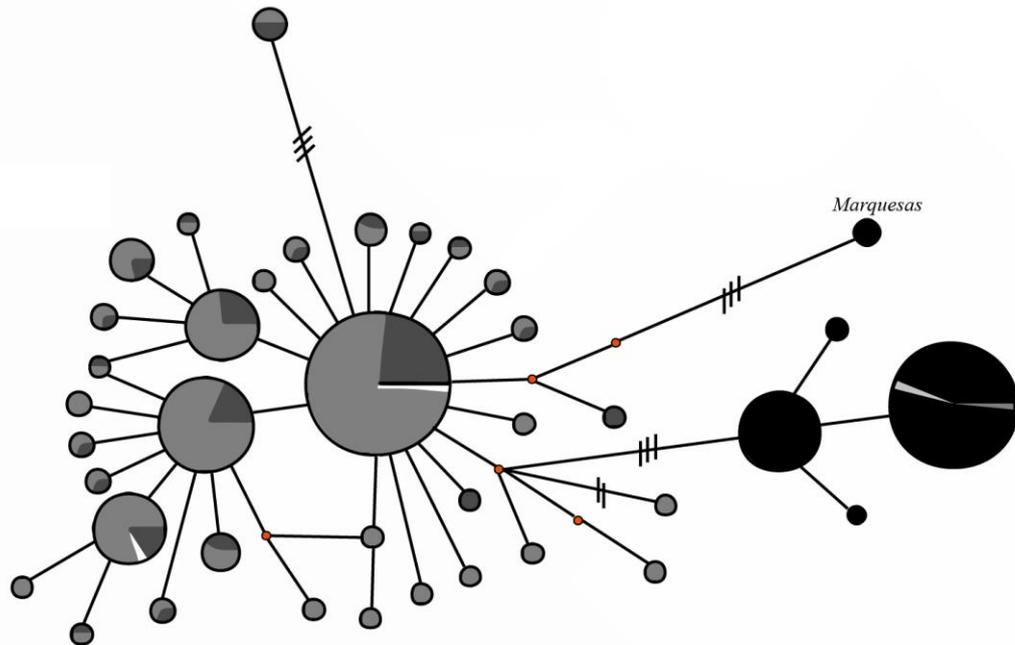


Figure 5 : Réseau d'haplotypes d'*Eleotris fusca*. Lorsque les mutations ne sont pas indiquées cela signifie qu'elles sont égales à un. Les points rouges sont appelés *median vector* et représentent les haplotypes non échantillonnés. La taille des cercles des haplotypes est proportionnelle au nombre d'individu partageant l'haplotype.

L'observation du réseau d'haplotypes d'*E. acanthopoma* (Fig. 6) permet de constater que l'espèce est répartie de manière homogène dans l'Indo-Pacifique. En effet, un haplotype central est retrouvé dans toutes les zones échantillonnées, excepté pour la zone Nord-Ouest de l'océan Indien (NWIO), mais ceci peut être dû au faible nombre de séquences obtenues pour cette zone (Tableau 10). Aucun isolement n'est constaté pour les îles du CPO et certains haplotypes sont retrouvés dans l'océan Indien comme dans l'océan Pacifique. L'arbre phylogénétique permet de confirmer ces observations, les spécimens d'*E. acanthopoma* forment un seul et même clade (0,6% de divergence) et aucune distinction n'est observée en fonction des localités (Fig. 7).

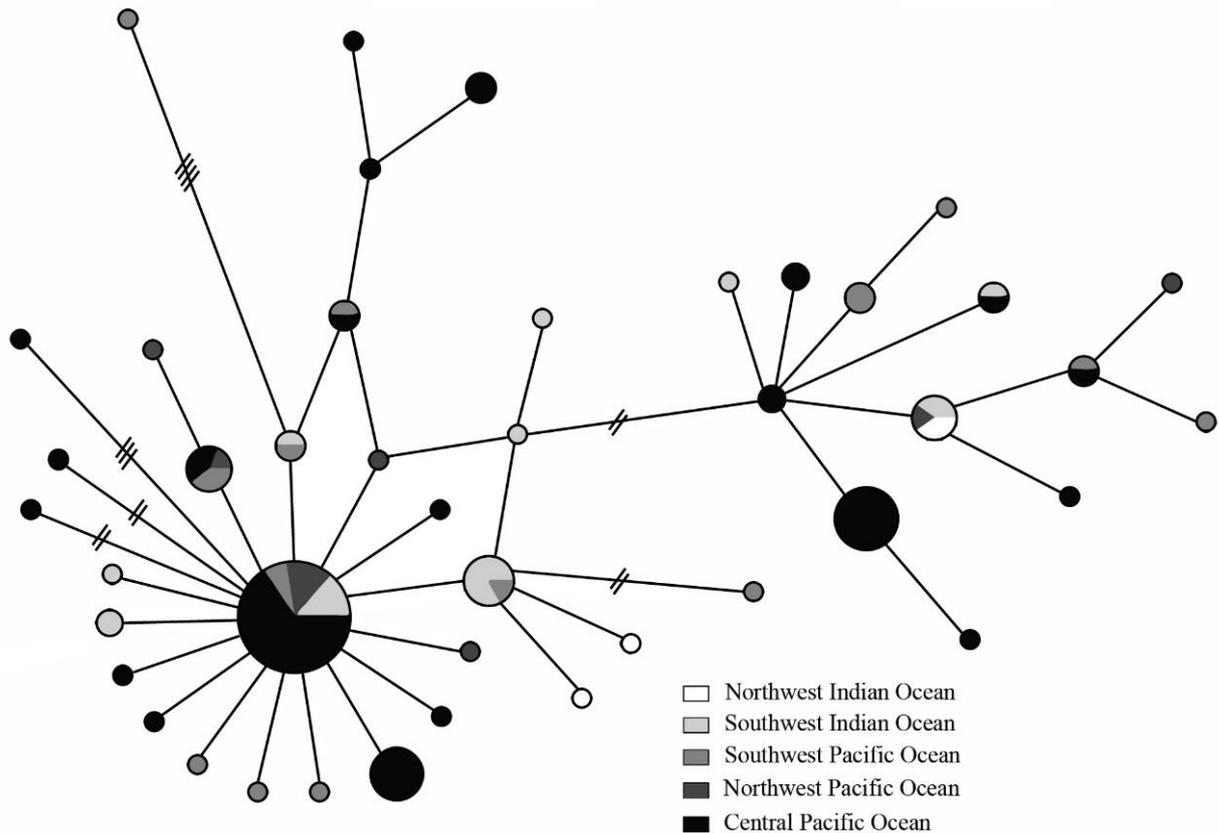


Figure 6 : Réseau d'haplotypes d'*Eleotris acanthopoma*. Lorsque les mutations ne sont pas indiquées cela signifie qu'elles sont égales à un. La taille des cercles des haplotypes est proportionnelle au nombre d'individu partageant l'haplotype.

A partir de ces deux analyses phylogéographiques, nous pouvons voir que, bien que *E. fusca* et *E. acanthopoma* soient toutes deux des espèces à large répartition, elles ne présentent pas du tout la même structure de populations au sein de l'Indo-Pacifique. *E. acanthopoma* semble disperser de manière homogène dans l'océan Indien et Pacifique tandis que *E. fusca* présente des populations différentes dans l'océan Pacifique et est peu représentée dans l'océan Indien.

La dispersion larvaire de ces deux espèces est donc différente. Il est probable que les larves d'*E. fusca* n'empruntent pas les mêmes voies de dispersion que celles d'*E. acanthopoma*, et que leur comportement dans la colonne d'eau soit différent. Mais il faut aussi tenir compte de l'aspect temporel, le passage des larves à travers les barrières ayant pu être facilité (ou non) selon les époques. Il est clair que des études supplémentaires, tant sur les traits d'histoire de vie que sur la datation des événements qui ont structurés l'évolution de ces espèces, sont

nécessaires pour expliquer ces différences. Ceci sera à inscrire dans les perspectives de ce travail.

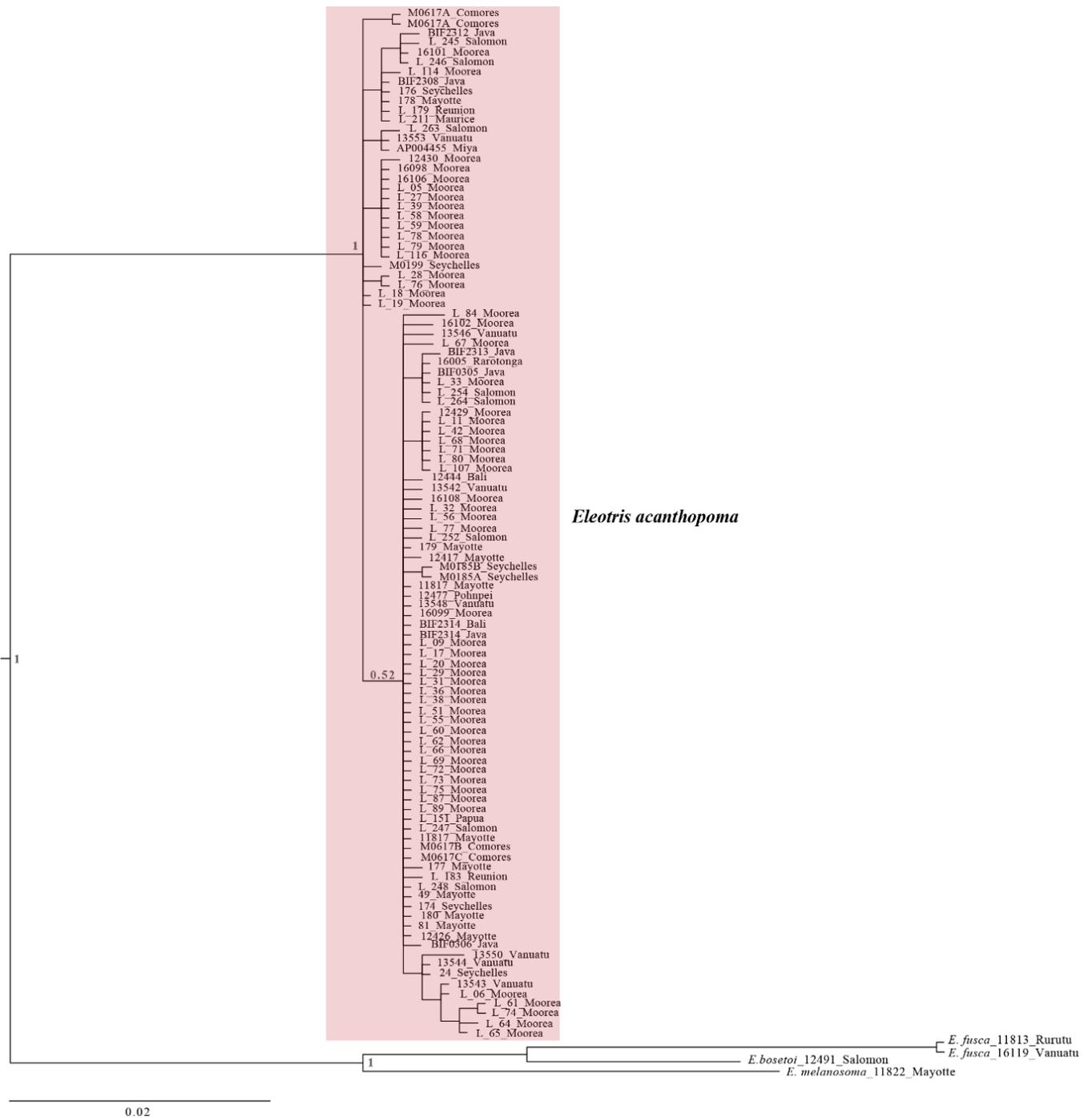


Figure 7 : Arbre phylogénétique d'*E. acanthopoma* construit par inférence bayésienne à partir d'un fragment du gène *COI* (585 pb). La robustesse des branches de chaque clade est donnée par les valeurs de probabilités postérieures exprimées en décimale.

Conclusion générale sur la phylogéographie de l'espèce *E. fusca* et comparaison avec *E. acanthopoma*

L'étude de la phylogéographie d'*E. fusca* nous a permis de mettre en évidence que deux espèces sont confondues sous ce nom. La première est une espèce cryptique et endémique de l'océan Indien, *E. cf. fusca* et, la seconde est *E. fusca* qui reste une espèce à large répartition mais néanmoins moins abondante dans l'océan Indien. Ces résultats seront à prendre en compte lors de la mise en place des nouveaux plans de gestion et de conservation sur les îles de l'océan Indien.

Comparer la phylogéographie d'*E. fusca* à celle d'*E. acanthopoma* permet de voir que les flux de gènes ne sont pas identiques entre les espèces, même si celles-ci présentent une aire de répartition semblable dans l'Indo-Pacifique. Cette différence de flux génétique devra faire l'objet d'études ultérieures pour appréhender l'évolution de ce groupe.

Dans le chapitre suivant, nous avons réglé le statut taxonomique d'*E. cf. fusca*, en lui donnant le nom approprié. Ce chapitre fait l'objet d'un article soumis.

**Mise en évidence d'une espèce
cryptique dans l'océan Indien sous le
nom d'*E. fusca* et revalidation
d'*E. klunzingerii***

**Mise en évidence de deux espèces avec le même pattern de papilles sensorielles
céphaliques confondues sous le nom d'*E. fusca* dans l'océan Indien.**

Article soumis

Résumé – Dans le genre *Eleotris*, l'observation des patterns de papilles sensorielles céphaliques permet de classer les spécimens dans différents groupes mais les caractères morpho-méristiques ne sont pas toujours discriminants et l'identification des espèces est difficile. Cependant, avec l'apport de la génétique, notamment avec le Barcoding (*COI*), la discrimination entre les espèces est facilitée. Une étude phylogéographique sur *E. fusca* dans l'Indo-Pacifique a révélé la présence de 2 espèces incluant une espèce cryptique possédant le même pattern de papilles sensorielles que cette dernière. L'une de ces deux espèces est composée en majorité de spécimens collectés dans l'océan Pacifique et l'autre de spécimens de l'océan Indien. 5,6% de divergence séparent ces deux espèces soit 32 sites diagnostiques sur les 585 pb séquencées du gène *COI*. Après l'examen de tous les types placés en synonymie d'*E. fusca* et natifs de l'océan Indien, nous avons conclu que le nom correspondant à l'espèce cryptique est *Eleotris klunzingerii* Pfeffer, 1893.

Molecular evidence of two species of the *Eleotris fusca* cephalic free neuromast pattern group (Teleostei: Gobioidae: Eleotridae) in the Indian Ocean

Article submitted

Abstract – The observation of the cephalic free neuromast pattern of the genus *Eleotris* permits to classify the specimens in different species groups but as diagnostic characters without overlapping are few, the exact species identification is known to be difficult. However, genetic analyses, particularly with barcoding (*COI*), facilitate the discrimination between species. In a recent paper about the phylogeography of *Eleotris fusca* in the Indo-Pacific area, two species have been revealed, including a cryptic one, with the same cephalic free neuromast pattern than the first. The first one included specimens mainly from the Pacific Ocean and the second one specimens from the Indian Ocean. They are separated with a mean pairwise divergence of 5.6% and presented 32 diagnostic nucleotide substitutions in the 585 bp of *COI*. After the examination of all the available synonyms types of *E. fusca* from the Indian Ocean, we concluded that the species name corresponding for the cryptic species is *Eleotris klunzingerii* Pfeffer, 1893.

Introduction

In the Indian Ocean area, there are three well known widespread species of *Eleotris* (Mennesson et al. 2016 *accepted*): *Eleotris fusca* (Bloch and Schneider, 1801) with a 2.4.6 cephalic free neuromast pattern, *E. acanthopoma* (Bleeker, 1853) with a 2.4 pattern and *E. melanosoma* (Bleeker, 1853) with a 2.3.4 pattern (see below, Fig. 1). These species are euryhaline and found in brackish waters. They are predators and prefer to be close to the riverbank where the current is slow, or in the lentic zones (Keith et al. 2010). It is well known that field identification of *Eleotris* species is difficult due to the lack of meristic characters without overlapping (Pezold & Cage 2002), the difficulty of observation of the neuromasts and because all the species are generally brown colour and look alike.

There are very few studies on taxonomy of the genus *Eleotris* (Pezold & Cage 2002) and some recent ones, using genetic analyses, found cryptic species (Guimarães-Costa et al. 2016; Mennesson et al. 2016 *in press*); Mennesson et al. (*submitted*). A recent phylogeography study of *Eleotris fusca* in the Indo-Pacific area by Mennesson et al. (*submitted*) revealed the presence of a cryptic and endemic species in the Indian Ocean (called *Eleotris cf. fusca* in this paper) with the same cephalic free neuromast pattern than the latter.

Several species with this neuromast pattern were described in the past in the Indian Ocean and were finally placed by different authors in synonymy with *Eleotris fusca* (Eschmeyer et al. 2016): *E. fornasini* Bianconi 1857, *E. klunzingerii* Pfeffer 1893, *E. soaresi* Playfair 1867, *E. cavifrons* Blyth 1860, *E. incerta* Blyth 1860 and *Cheilodipterus Cuius* Hamilton 1893. Thus, the aim of this paper is to study the cryptic species found and to compare it with its congeners described from the Indian Ocean.

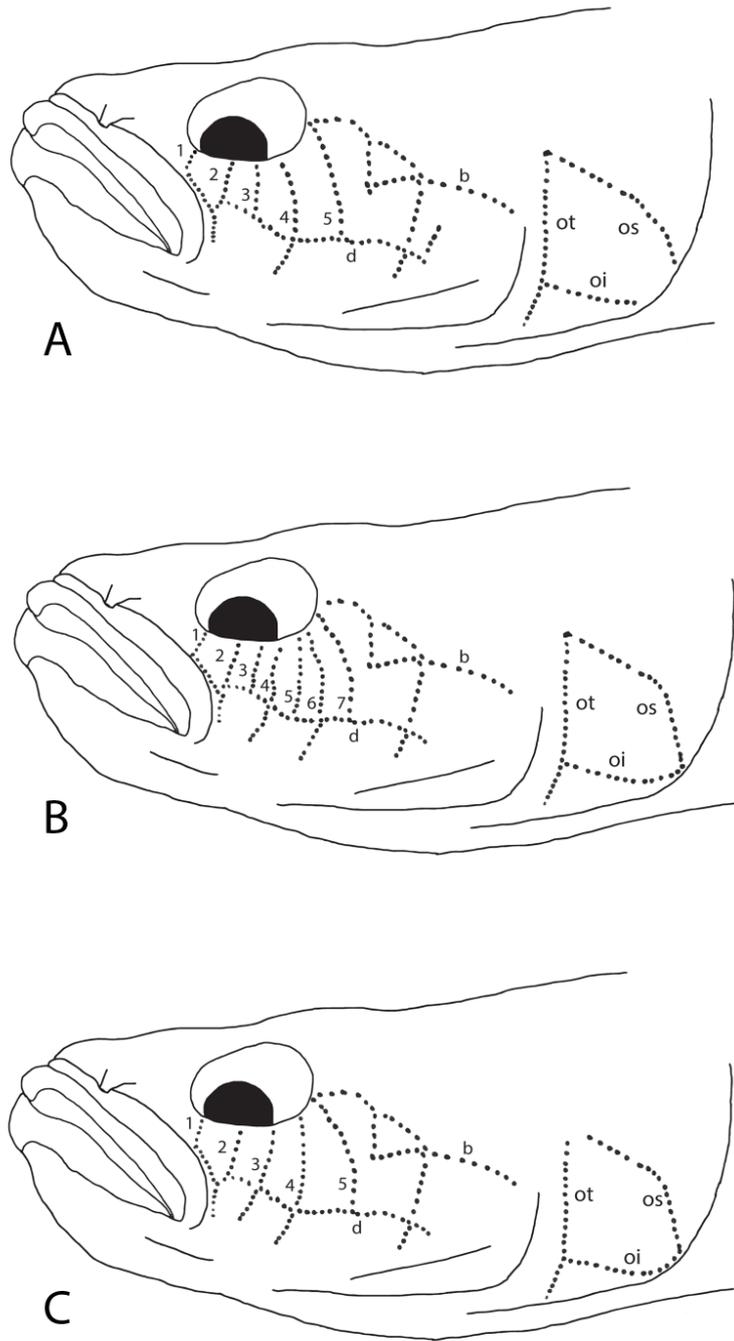


Figure 1: Schematic illustrations showing main cephalic free neuromast patterns of A- *Eleotris acanthopoma* (Holotype – RMNH 25934), B- *Eleotris niger* (Syntype – MNHN A.1578) synonym of *E. fusca*, and C- *Eleotris melanosoma* (Syntype – RMNH 4815).

I. Materials & methods

1. Material

40 *Eleotris* specimens with the *E. fusca* cephalic free neuromast pattern were sampled in 11 island rivers from the Indo-Pacific area (Vanuatu, Rarotonga, Moorea, Solomon, Samoa, Reunion, Mayotte, Seychelles, Anjouan, Moheli islands and Madagascar) using a DEKA 3000 electrofishing system (Gerätebau, Marsberg, Germany). They were compared with 3 other *Eleotris* species (*E. acanthopoma*, *E. melanosoma*, and *E. bosetoi*), including type specimens, and deposited in museum collections (see comparative material).

2. DNA analysis

A total of 19 *Eleotris* tissue samples collected in the Indo-Pacific area and held in the Muséum national d'Histoire Naturelle (MNHN) (Table 1) were used for genetic analyses, as well as the types for *E. fornasini* (BMNH 1852.9.13.179) and *E. bosetoi* (MNHN 2015-0380, tag 13529; MNHN 2015-0379, tag 13528; MNHN 2016-0001, tag 12491). For DNA extraction we used Macherey & Nagel NucleoSpin® Tissue kits following the manufacturer's instructions on an Eppendorf EpMotion 5075. A mitochondrial fragment of the *COI* gene (585 bp) was amplified using the specific fish primers TelF1 5'TCGACTAATCAYAAAGAYATYGGCAC3' and TelR1 5'ACTTCTGGGTGNCCAAARAATCARAA3' (Dettai et al. 2011). DNA amplification was performed by PCR in a final 20 µL volume containing 5% DMSO, 1 µL of dNTP 6.6 µM, 0.15 µL of Qiagen Taq DNA polymerase, using 2 µL of the buffer provided by the manufacturer, and 0.4 µL of each of the two primers at 10 pM; 1.2 µL of DNA extract was added. After denaturation for 2 min at 94°C, the PCR was run for 55 cycles of (25s, 94°C; 25s, 54°C; 55s, 72°C) on a Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler. Successful PCRs were selected on ethidium-bromide stained agarose gels. Sanger sequencing was performed in both directions by a commercial company (Eurofins; <http://www.eurofins.fr>) using the same primers. For the outgroup, we included a sequence of *Hypseleotris agilis* (JN021219) from GenBank.

Table 1. Details of tissue samples of *Eleotris* specimens used for the DNA analysis.

Countries	Islands	<i>E.klunzingerii</i>	<i>E.bosetoi</i>	<i>E.fusca</i>	<i>E.acanthopoma</i>	<i>E.melanosoma</i>
Society Islands	Moorea			MNHN 2016-0024	MNHN 2016-0025	
Cook Islands	Rarotonga				MNHN 2016-0026	
Vanuatu	Maewo				MNHN 2016-0027	
–	Epi			MNHN 2015-0378		
New Caledonia	Grande Terre					
Samoa	Upolu			MNHN 2015-0364		
Salomon	Choiseul		MNHN 2015-0380 MNHN 2015-0379			
–	Kolobangara		MNHN 2016-0001			MNHN 2016-0030 MNHN 2016-0031 MNHN 2016-0032
Mozambique	–			BMNH 1852.9.13.179		
Mascarene Islands	Reunion	MNHN 2016-0091				
Seychelles Islands	Silhouette	MNHN ICTI 6638				
Mayotte Island	Mayotte	MNHN 2016-0090				
Comoros Islands	Anjouan	MNHN ICTI 6639				
–	Moheli	MNHN ICTI 6640				
Masdagascar	Madagascar	MNHN ICTI 6641				
	Total	N = 6	N = 3	N = 4	N = 3	N = 3

Data processing and sequence assembly were done in Geneious 9.0.5 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al. 2012). All the *COI* sequences were aligned with Muscle Alignment. The phylogenetic analysis was performed using Bayesian inference (MrBayes 3.2; Ronquist et al. 2012) with the model HKY + G computed by jModelTest 2.1.1 (Guindon & Gascuel, 2003; Darriba et al. 2012). Four independent analyses were run for 10 million generations, sampling every 200 generations. Ten percent of the trees were discarded as burn-in, after having checked that it was sufficient for convergence. After checking convergence had been reached, the trees and parameters resulting from the four analyses were pooled and combined in a consensus. Intra- and inter- specific distances (*p*-distances) were obtained with the Muscle algorithm in Geneious.

3. Morpho-meristic

Methods follow Keith et al. (2012). Measurements of specimens were taken with a dial calliper to the nearest tenth of a millimetre. All counts were taken from the right side. The size is given as standard length (SL). Abbreviations for institutions and collections cited

follow <http://www.asih.org/resources/standard-symbolic-codes-institutional-resource-collections-herpetology-ichthyology>.

Scale and fin ray counts are reported as: A, anal fin elements (includes flexible spine and segmented rays); D, dorsal fins (D1, first dorsal fin spines; D2, second dorsal fin elements); P, pectoral fin rays; C, caudal fin rays (only branched rays are reported); LS, scales in lateral series counted from upper pectoral fin base, or anteriormost scale along lateral midline, to central hypural base; PD, predorsal midline scales counted from scale directly anterior to first dorsal fin insertion to the anteriormost scale; TRB, transverse series backward, refers to scales counted from the first scale anterior to second dorsal fin origin, in a diagonal manner, posteriorly and ventrally to the anal fin base or ventralmost scale; TRF, transverse series forward, refers to scales counted from the first scale anterior to second dorsal fin origin, in a diagonal manner, anteriorly and ventrally to the centre of abdomen or ventralmost scale; ZZ, zigzag series, refers to scales on the narrowest region of the caudal peduncle counted from the dorsalmost scale to the ventralmost scale in a zigzag (alternating) manner.

Eleotris species are mainly distinguished by the superficial neuromast patterns of the head (Akihito 1967). Cephalic neuromast distribution patterns were examined and illustrated with the aid of a dissecting microscope and camera lucida. Cephalic neuromast patterns are described using terminology developed by Sanzo (1911) with modifications employed by Miller & Wongrat (1991) and Pezold & Cage (2001). Transverse opercular rows are labelled ot. Upper and lower longitudinal rows on the operculum are labeled os and oi, respectively. Transverse suborbital rows are designated with Arabic numbers and major horizontal rows on the cheek are indicated with the letters b and d.

To simplify references to the particular transverse suborbital rows crossing row d, a formula of row numbers separated by periods is used (see Pezold & Cage 2001). For example, if rows 2, 4 and 6 cross row d, this condition is represented by the formula '2.4.6'.

The main cephalic neuromast pattern of the three most common *Eleotris* in Indian Ocean are presented with schematic drawings in Figure 1. For this figure, we used a syntype of *E. melanosoma* (RMNH 4815), the holotype of *E. acanthopoma* (RMNH 25934) and as there is no type known for *E. fusca*, we used a syntype of *E. niger* (MNHN A-1578), which is a synonym of *E. fusca*.

II. Results & discussion

1. Genetic results

The phylogenetic tree-based on the *COI* gene (585 pb), among the *Eleotris* sampled, supported species-level differentiation (Fig. 2). *E. acanthopoma* is separated, with a 14% mean pairwise divergence, from the clade A that included the four congeneric species, *E. melanosoma*, *E. bosetoi*, *E. fusca* and the *Eleotris* first considered as *E. fusca* from the Indian Ocean and called here *E. cf. fusca*. A 12% mean pairwise divergence is observed between *E. melanosoma* and the clade B. *E. bosetoi* is separated with a 10% mean pairwise divergence from the *E. fusca* and *E. cf. fusca* (Clade C) and, these two sister species are separated from each other by a mean pairwise divergence of 5.6%, although they were in the past considered by the scientific community as the same species (Hoesse 1986). The type of *E. fornasini* Bianconi 1857 is included in the *E. fusca* clade and is so a synonym of this species.

So, the genetic analysis revealed a distinct species from *E. acanthopoma*, *E. melanosoma*, *E. bosetoi* and *E. fusca*. *E. cf. fusca*, found only in the Indian Ocean, is characterised by 32 fixed nucleotide substitutions compared to its sister species *E. fusca* (Table 2).

Table 2. List of the 32 diagnostic nucleotide substitutions found in the 585 bp of the cytochrome c oxidase subunit (*COI*) between *E. fusca* and *E. klunzingerii* and compared to the other *Eleotris* species.

Nucleotide position	6	9	21	45	84	105	135	147	150	153	166	174	231	255	258	273
<i>E. acanthopoma</i>	A	G	A	A	T	T	G	C	T	C	T	C	A	T	C	T
<i>E. melanosoma</i>	G	A	A	A	C	T	A	T	T	C	T	T	A	C	T	C
<i>E. bosetoi</i>	A	A	A	A	C	C	A	T	T	C	T	C	A	C	C	C
<i>E. fusca</i>	A	G	A	G	C	C	G	T	T	C	T	C	A	C	C	G
<i>E. klunzingerii</i>	G	A	G	A	T	T	A	C	C	A	C	T	G	T	T	A

Nucleotide position	300	306	316	354	363	376	397	435	438	456	462	483	507	540	546	549
<i>E. acanthopoma</i>	A	A	C	T	C	C	C	G	G	A	A	T	A	T	A	G
<i>E. melanosoma</i>	A	T	C	C	T	C	T	G	A	A	A	T	A	C	A	G
<i>E. bosetoi</i>	A	C	C	T	C	C	T	A	A	A	A	C	G	T	G	A
<i>E. fusca</i>	A	C	T	C	T	T	T	G	G	G	A	T	A	T	G	C
<i>E. klunzingerii</i>	G	T	C	T	C	C	C	A	A	A	G	C	G	C	A	G

2. Morpho-meristic comparison

E. fusca and *E. cf. fusca* have the same opercular row patterns and the same “2.4.6” cephalic neuromast pattern (Fig. 1). Although they are clearly genetically different, the morpho-meristic characters are overlapping (Table 3) but there are generally more transverse scales in forward series (TRF) for *E. cf. fusca* in males (18-30 vs. 13-22).

Table 3. Morphometric values for *E. fusca* and *E. cf. fusca* expressed to the nearest whole percent of standard length. Indo-P: Indo-Pacific.

			Lateral series (Lse)														
			53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
<i>Eleotris cf. fusca</i>	Indien	male						1	4	1	-	1	-	-	-	1	
		female				1	-	-	1	-	2	1	-	1			
<i>Eleotris fusca</i>	Indo-P	male	1	-	1	5	2	1	1	-	-	1	-	-	-	-	2
		female	1	-	1	-	-	-	1	2	2	1	1	2			

			Predorsal midline series (PD)																								
			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
<i>Eleotris cf. fusca</i>	Indien	male										1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
		female																									
<i>Eleotris fusca</i>	Indo-P	male					1	-	-	1	-	1	3	2	-	1	-	-	-	1							
		female	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-

			Transverse backward series (TRB)									Zigzag series (ZZ)								
			13	14	15	16	17	18	19	20	21	12	13	14	15	16	17			
<i>Eleotris cf. fusca</i>	Indien	male				1	1	1	4	-	1	<i>Eleotris cf. fusca</i>	Indien	male	2	1	1	1	1	2
		female				1	1	1	2	1	female			2	2	1	1			
<i>Eleotris fusca</i>	Indo-P	male			4	2	5	3	<i>Eleotris fusca</i>	Indo-P	male	4	1	3	3	2	1			
		female	1	-	-	-	5	-			3	1	1	female	2	2	3	3	1	

			Transverse forward series (TRF)																	
			13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
<i>Eleotris cf. fusca</i>	Indien	male							1	-	1	-	1	-	1	1	1	-	-	1
		female											1	-	-	2	1	1	1	
<i>Eleotris fusca</i>	Indo-P	male	1	2	1	2	-	3	3	-	2	1								
		female	1	-	1	1	2	1	-	1	-	-	1	2	1					

			Second Dorsal Length (%SDL)														
			20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
<i>Eleotris cf. fusca</i>	Indien	male							1	1	-	1	2	-	3		
		female							1	2	3						
<i>Eleotris fusca</i>	Indo-P	male	1	-	2	-	-	2	1	1	-	2	4	1	1	-	1
		female			1	-	1	3	-	3	1	-	1				

Table 3. Morphometric values for *E. fusca* and *E. cf. fusca* expressed to the nearest whole percent of standard length. Indo-P: Indo-Pacific.

			Anal fin Length (%AL)							
			23	24	25	26	27	28	29	30
<i>Eleotris cf. fusca</i>	Indien	male			2	1	2	1	1	1
		female			1	3	2			
<i>Eleotris fusca</i>	Indo-P	male	2	1	2	2	1	1	5	1
		female	1	4	2	2	-	2		

			Caudal Fin Length (%CL)																		
			21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
<i>Eleotris cf. fusca</i>	Indien	male				1	-	-	1	-	2	2	-	-	2						
		female							1	1	1	1	1	-	1						
<i>Eleotris fusca</i>	Indo-P	male	1	-	-	1	-	1	2	1	1	-	2	4	2						
		female						1	1	-	2	1	1	-	1	1	1	-	1	-	1

			Jaw Length (%JL)									
			6	7	8	9	10	11	12	13		
<i>Eleotris cf. fusca</i>	Indien	male		1	-	-	1	4	2			
		female					1	2	2	1		
<i>Eleotris fusca</i>	Indo-P	male		1	-	1	2	4	5	2		
		female	1	-	1	1	2	3	3			

			Caudal Peduncle depth (%CPD)						
			11	12	13	14	15	16	17
<i>Eleotris cf. fusca</i>	Indien	male			2	1	3	2	
		female			4	-	2		
<i>Eleotris fusca</i>	Indo-P	male	2	-	1	1	5	2	1
		female		2	2	7	2		

			Body Depth at second dorsal fin origin in males (%BDM)								
			17	18	19	20	21	22	23	24	25
<i>Eleotris cf. fusca</i>	Indien	male			1	2	-	2	2	-	1
		female									
<i>Eleotris fusca</i>	Indo-P	male	1	1	2	3	4	1	-	2	
		female									

			Head Length (%HL)							
			30	31	32	33	34	35	36	37
<i>Eleotris cf. fusca</i>	Indien	male	1	2	2	1	2			
		female		3	-	-	2	1		
<i>Eleotris fusca</i>	Indo-P	male		1	4	5	4	1		
		female		1	2	4	1	1	1	1

Table 3. Morphometric values for *E. fusca* and *E. cf. fusca* expressed to the nearest whole percent of standard length. Indo-P: Indo-Pacific.

			Predorsal Length (%PDL)												
			39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
<i>Eleotris cf. fusca</i>	Indien	male			1	–	–	3	1	–	1	1	–	–	1
		female	1	–	–	1	1	1	1	–	–	1			
<i>Eleotris fusca</i>	Indo-P	male			1	–	–	3	3	–	5	1	2		
		female			1	–	2	1	2	3	–	–	2		

			Preanal Length (%PAL)											
			61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
<i>Eleotris cf. fusca</i>	Indien	male			1	1	1	1	–	1	2	1		
		female							1	1	2	2		
<i>Eleotris fusca</i>	Indo-P	male			2	1	5	2	1	1	–	1	1	1
		female	1	–	–	2	2	2	–	–	3	1		

3. Revalidation of *Eleotris klunzingerii* Pfeffer 1893

Among the several species placed in synonymy with *Eleotris fusca* (Eschmeyer et al. 2016), for the *E. cavifrons* Blyth 1860, *E. incerta* Blyth 1860 and *Cheilodipterus Cuius* Hamilton 1893, no types are known so we follow Kottelat (2013) who placed them as synonyms of *E. fusca*. After the examination of *E. soaresi* syntype we concluded that it is a synonym of *E. melanosoma* and not of *E. fusca*. With the permission of the BMNH, the DNA of *E. fornasini* holotype (BMNH 1852.9.13.179)* has been extracted and used to amplify the *COI* gene (585 pb) revealing its affiliation to *E. fusca* (Pacific area) (Fig. 2). Finally, after the examination of the type of *E. klunzingerii* we concluded that the species is valid and is the right name for *E. cf. fusca* cited by Mennesson et al. (*submitted*).

*Note: the status of BMNH 1852.9.13.179 is uncertain. It is cited in Eschmeyer et al. (2011) as a syntype of *E. mauritiana*. But it is labelled as the holotype of *E. fornasini* in Kottelat, 2013.

4. Distribution

E. klunzingerii Pfeffer, 1893 is currently known only in the Indian Ocean (Zanzibar, Reunion, Mayotte).

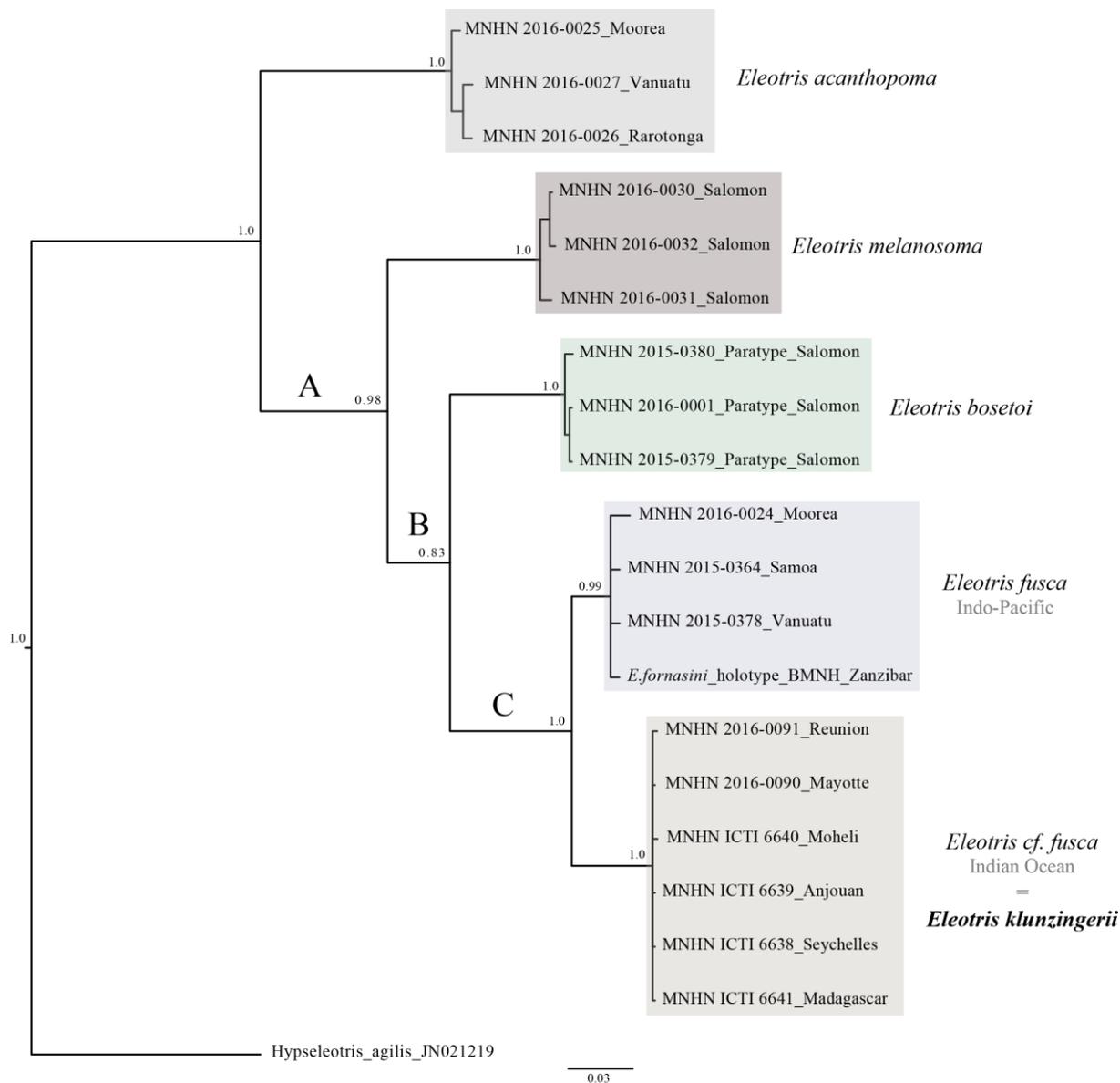


Figure 2. Bayesian tree of the cytochrome c oxidase subunit (COI) for sequenced specimens of *Eleotris*. Numbers on the nodes represent posterior probabilities. The five *Eleotris* species are highlighted with boxes.

5. Material examined

Eleotris klunzingerii Pfeffer, 1893; ZMH-H412 holotype; Zanzibar.

MNHN 2016-0089, 1 male, Mayotte, 09/11/2003, Marquet et al. coll; tag 11816. MNHN 2016-0090, 1 male, 2 females, Mayotte, 20/04/2009, Feutry & ARDA coll; tag 11819, 11820, 11821. MNHN 2016-0091, 1 male, 4 females, Reunion Island, 24/03/2007, Marquet, Zimmermann coll; 11824, 11826, 11827, 11828, 11829. MNHN 2016-0092, 3 males, 1 female, Reunion Island, ARDA; 12405, 12406, 12407, 12408.

6. Comparative material

Eleotris fusca Bloch & Schneider, 1801 - *Eleotris niger* Quoy and Gaimard, 1824; MNHN A-1578 syntype; Waigeo, Indonesia. *Eleotris vitianus* Sauvage, 1880; MNHN A-1420 syntypes (2 from 4); Fiji Islands. *Eleotris fornasini* Bianconi, 1857; BMNH 1852.9.13.179 holotype; Mozambique. *Eleotris andamensis* Herre, 1939; CAS-SU 37152; Andaman Islands. MNHN 2015-0364, 1 male, 1 female (78.2-95.4 mm SL), Samoa, Upolu, 25/7/2008, Keith et al. coll; tags 16023, 16024. MNHN 2015-0365, 2 males, 1 female (45.2-58.2 mm SL), Bali, Tukad Unda, Indonesia, 22/4/2014, Keith et al. coll; tags 12443, 12446, 12447. MNHN 2015-0366, 1 female (58.4 mm SL), Ua Uka, Marquesas, 24/2/2009, Pascal et al. coll; tag 16087. MNHN 2015-0367, 1 male (52.8 mm SL), Kumafa, Papua, 15/10/2010, Keith et al. coll; tag 16015. MNHN 2015-0368, 1 male (32.7 mm SL), Tireloach, Palau, 28/2/2011, Keith et al. coll; tag 16017. MNHN 2015-0369, 1 male (32.7 mm SL), Pohnpei, 14/3/2012, Keith et al. coll; tag 16019. MNHN 2015-0370, 1 male (64.8 mm SL), Lokapava, Choiseul, Solomon, 21/10/2014, Keith et al. coll; tag 13531. MNHN 2015-0371, 1 female (33.8 mm SL), Maewo, Vanuatu, 12/11/2007, Keith et al. coll; tag 16124. MNHN 2015-0372, 1 female (47.3 mm SL), Moorea, French Polynesia, 06/2007, Sasal et al. coll; tag 16097. MNHN 2015-0373, 1 female (55.7 mm SL), Rurutu, French Polynesia, 06/2001, Keith et al. coll; tag 16094. MNHN 2015-0374, 1 female (62 mm SL), Tubuai, French Polynesia, 07/2007, Sasal et al. coll; tag 16086. MNHN 2015-0375, 1 male (71 mm SL), Alegre, Philippines, 5/2/2014, Gaulke et al. coll; tag 12450. MNHN 2015-0376, 1 female (42.6 mm SL), Samoa, Upolu, Palilua riv., 24/7/2008, Keith et al. coll; tag 16020. MNHN 2015-0377, 1 male (47 mm SL), Papua, 26/10/2008, Keith et al. coll; tag 16018. MNHN 2015-0378, 1 female (42.6 mm SL), Vanuatu, Epi,

Buavinai, 27/11/2014, Mennesson et al. coll; tag 13526. MNHN 2015-0383, juvenile (21.45 mm SL), New Caledonia, Wan Pwé On, 02/02/2013, Taillebois et al. coll; tag L-207. MNHN 2016-0024, 1 male (71.1 mm SL), Moorea, French Polynesia, 07/2007, Sasal et al. coll; tag 11777.

E. melanosoma Bleeker, 1853 - RMNH 4815 syntype, 1 male (62.4 mm SL); Wahai, Sumatra, Indonesia. *E. soaresi* Playfair, 1867 - BMNH 1856.3.18.26-27 syntypes, 2 males (70.1 mm and 101.1 mm SL); Mozambique, Africa. MNHN 2016-0030, 1 male (49.9 mm SL), Vage riv., Kolobangara, Solomon, 10/11/2015, Keith et al. coll; tag 12397. MNHN 2016-0031, 1 male (52.9 mm SL), Vanga riv., Kolobangara, Solomon, 1/11/2015, Keith et al. coll; tag 12487. MNHN 2016-0032, juvenile (32.8 mm SL), Zamba riv., Kolobangara, Solomon, 10/11/2015, Keith et al. coll; tag L-229.

E. bosetoi Mennesson, Keith, Ebner and Gerbeaux, 2016 - MNHN 2015-0382 holotype, female (101.6 mm SL), Zamba River, Kolobangara Island, Solomon Islands; 10 Nov. 2015; Keith, Lord, Boseto and Marquet coll.; tag 13558. *Paratypes*. - MNHN 2015-0380, female (70 mm SL), Lokasereke River, Choiseul Island, Solomon Islands; 13 Oct. 2014; Keith, Marquet, Gerbeaux, Boseto and Ebner coll.; tag 13529. MNHN 2015-0379, female (77.6 mm SL), Pisuku River, Choiseul Island, Solomon Islands; 10 Oct. 2014; Keith, Marquet, Gerbeaux, Boseto and Ebner coll.; tag 13528. MNHN 2016-0001, male (49.4 mm SL), Vanga River, Kolobangara Island, Solomon Islands; 18 Nov. 2015; Keith, Lord, Boseto and Marquet coll.; tag 12491.

E. acanthopoma Bleeker, 1853 - RMNH 25934 holotype, 1 male (85.7 mm SL); Sumatra, Indonesia. MNHN 2016-0025, 1 male (48.9 mm SL), Moorea, French Polynesia, 06/2007, Salsa et al. coll; tag 16098. MNHN 2016 - 0026, 1 male (44.9 mm SL), Rarotonga, 07/2010, Keith et al. coll; tag 16005. MNHN 2016 -0027, 1 male (47.8 mm SL), Gaua, Kaska riv., Vanuatu, 05/11/2014, Mennesson et al. coll; tag 13546.

Acknowledgments

The study was made possible by a grant given to the French Ichthyological Society in the context of the ‘Critical Ecosystem Partnership Fund (CEPF)’ (Melanesia hotspot). The Critical Ecosystem Partnership Fund is a joint initiative of l’Agence Française de

Développement, Conservation International, the Global Environment Facility, the Government of Japan, the MacArthur Foundation and the World Bank. A fundamental goal is to ensure civil society is engaged in biodiversity conservation.

For the Seychelles, we would like to thank the UNDP and particularly E. Henriette, B. Santerre and their team. Thanks to R. Fanchette, Ministry of Environment and Energy, Wildlife, Trade and Conservation section, for agreeing to the transfer of material. For the Comoros, we would particularly like to thank Yahaya Ibrahim (CNDRS). For Madagascar, we are grateful to J. Aride from Madagascar National Parks (MNP-ANGAP), to the Manager of Masoala National Parc at Maroantsetra, and to the DIAMSOI team. For Reunion and Mayotte, we thank the Environnement Office, the Agriculture Office, and ARDA. For the Solomon Islands, we would like to acknowledge the customary landowners, villages and tribes, ESSI and the Solomon Islands' Government for the support and facilitation of the legal process. For Vanuatu, we would like to acknowledge the Department of Environmental Protection and Conservation (DEPC) and D. Kalfatak for providing us the research permit. For Samoa, we acknowledge the Samoan Ministry of Natural Resources Environment and Meteorology and Conservation International. For the Cook Islands, we would like to thank the Office of the Prime Minister of the Cook Islands in Rarotonga. For French Polynesia, we especially want to thank the Research Delegation (especially J.Y. Meyer), and the Environment Delegation. For the loan of specimens, we thank: D. Catania (CAS), R. de Ruiter (RMNH), S. Dorow, H. Zetzsche, T.J. Alpermann and F. Krupp (SMF), S. Morrison and G.R. Allen (WAM), R. Vonk and H. Praagman (ZMA), R. Hadiaty (MZB), S. Merker (SMNS), I. Eidus (ZMH), T. Heath and J. Maclaine (BMNH), L. Parenti, J. Williams, L. Palmer and S. Raredon (USNM), P. Pruvost, R. Causse, Z. Gabsi, C. Ferrara, M. Hauteœur (MNHN). Finally, we would like to thank the "Service de systématique moléculaire" of the MNHN (CNRS UMS 2700) for the laboratory access and the assistance provided.

Conclusion sur la mise en évidence d'une espèce cryptique dans l'océan Indien

Cette étude constate que la distinction morphologique entre *E. cf. fusca* et *E. fusca* est loin d'être facile étant donné que tous les caractères morpho-méristiques se chevauchent ; seul le nombre d'écailles sur la série transverse antérieure (TRF) semble plus important pour les males d'*E. cf. fusca* (18-30 vs. 13-22). Cependant, avec le séquençage du gène *COI* (585 pb), nous pouvons confirmer que nous sommes bien face à deux espèces divergeant l'une de l'autre de 5,6% pour ce marqueur soit 32 sites diagnostiques. Ceci est renforcé par les résultats obtenus avec le séquençage du gène *Rh* lors de l'étude phylogéographique du complexe « *E. fusca* » (cf. chapitre précédent).

Après l'examen de tous les types placés en synonymie d'*E. fusca* et natifs de l'océan Indien, nous avons conclu que le nom adéquat pour *E. cf. fusca* est *Eleotris klunzingerii* Pfeffer 1893. Et nous pouvons ainsi mettre à jour la liste des *Eleotris* de l'Indo-Pacifique (Tableau 4) qui comptabilise **16 espèces valides**.

Dans le dernier chapitre, nous allons nous intéresser à la **dispersion larvaire** chez *E. fusca* et *E. klunzingerii* au travers d'une étude d'otolithométrie.

Tableau 4 : Nouvelle liste des espèces valides d'*Eleotris* de l'Indo-Pacifique. Les noms d'espèces sont regroupés en fonction des combinaisons de patterns de papilles sensorielles (code couleurs de la Fig. 3, chapitre 2) et classés par date de publication. Les noms valides sont surlignés en **jaune** et celui en **jaune pâle** est à vérifier. Le symbole x signifie que l'absence de type n'a pas permis de statuer sur le nom de l'espèce.

Nom valide	Auteur(s)	Localité type	Type(s)	Statut de l'espèce
<i>Eleotris fusca</i>	Bloch & Schneider, 1801	Raiatea, French Polynesia	Type à définir ?	espèce valide
<i>Poecilia fusca</i>	Bloch & Schneider, 1801	Polynésie Française	Pas de type	x
<i>Cheilodipterus culius</i>	Hamilton, 1822	India, Bengal	Pas de type	x
<i>Eleotris niger</i>	Quoy & Gaimard, 1824	Indonesia, Waigeo	Syntype	synonyme d' <i>E. fusca</i>
<i>Eleotris brachyurus</i>	Bleeker, 1849	Southern Java, Patjitan	Syntypes	x
<i>Eleotris fornasini</i>	Bianconi, 1857	Mozambique	Holotype	synonyme d' <i>E. fusca</i>
<i>Eleotris incerta</i>	Blyth, 1860	India (OI)	Pas de type	x
<i>Eleotris cavifrons</i>	Blyth, 1860	Andaman Island (OI)	Pas de type	x
<i>Eleotris vitianus</i>	Sauvage, 1880	Fiji Islands	Syntypes	synonyme d' <i>E. fusca</i>
<i>Eleotris klunzingerii</i>	Pfeffer, 1893	Zanzibar	Holotype (photos)	espèce valide
<i>Eleotris andamensis</i>	Herre, 1939	Andaman Island	Paratypes	synonyme d' <i>E. fusca</i>
<i>Eleotris bosetoi</i>	Mennesson et al., 2016	Solomon Island	Holotype	espèce valide
<i>Eleotris melanura</i>	Bleeker, 1849	Southern Java, Pasuruan	Type ?	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Eleotris melanosoma</i>	Bleeker, 1853	Western Sumatra, Wahai	Syntypes	espèce valide
<i>Eleotris pseudacanthopomus</i>	Bleeker, 1853	Western Sumatra	Holotype	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Culius macrocephalus</i>	Bleeker, 1857	Indonesia - Buru	Holotype	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Eleotris soaresi</i>	Playfair, 1867	Mozambique	Syntypes	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Culius insulindicus</i>	Bleeker, 1875	Indonesia - Sumatra	Syntypes	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Culius macrolepis</i>	Bleeker, 1875	Indonesia - Ambon	Syntypes	synonyme d' <i>E. melanosoma</i>
<i>Eleotris fortis</i>	Tanaka, 1912	Taiwan	Type perdu	x
<i>Eleotris hainanensis</i>	Chen, 1933	China	Pas de type	x
<i>E. cf. melanosoma</i> sp1	–	–	–	espèce valide
<i>E. cf. melanosoma</i> sp2	–	Mayotte	–	espèce valide
<i>E. cf. melanosoma</i> sp3	–	Bali	–	espèce valide
<i>Eleotris eigenmanni</i>	Popta, 1921	Indonesia	Lecto et Paralectotypes	espèce valide
<i>Eleotris acanthopoma</i>	Bleeker, 1853	Sumatra	Holotype	espèce valide
<i>Eleotris mauritiana</i>	Bennett, 1832	West Indian Ocean	Holotype ?	synonyme d' <i>E. acanthopoma</i>
<i>Eleotris sandwicensis</i>	Vaillant & Sauvage 1875	Hawaiian Islands	Syntypes	espèce valide
<i>Eleotris aquadulcis</i>	Allen & Coates, 1990	Papua	Paratypes	espèce valide
<i>Eleotris pellegrini</i>	Maugé, 1984	Madagascar	Syntypes	espèce valide
<i>Eleotris vomerodentata</i>	Maugé, 1984	Madagascar	Holotype	espèce valide
<i>E. cf. pellegrini</i>	–	Madagascar & Seychelles	–	espèce valide ?
<i>Eleotris oxycephala</i>	Temminck & Schlegel, 1845	Japon	Possible syntype	espèce valide
<i>Eleotris cantherius</i>	Richardson, 1846	China	Pas de type	x
<i>Eleotris balia</i>	Jordan & Seale, 1905	Japon & Chine	Holotype	espèce valide
<i>Eleotris lutea</i>	Day, 1876	Andaman Island	Syntypes	x
<i>Eleotris pallida</i>	Castelnau, 1875	Australia	Pas de type	x
<i>Eleotris fasciatus</i>	Chen, 1964	Taiwan	Pas de type	x

Etude de la dispersion larvaire chez *E. fusca* et *E. klunzingerii*

Préambule :

Les premières analyses que nous avons menées au cours de cette thèse, chez *E. fusca* concernaient la dispersion larvaire *via* l'étude microstructurale et microchimique des otolithes. Elles ont été menées en parallèle de l'étude de taxonomie/phylogéographie et les résultats ont été publiés avant la fin de cette dernière. En effet, l'étude génétique, en particulier le séquençage des mitogénomes, s'est révélée assez longue. N'ayant donc pas encore connaissance de la présence d'une seconde espèce (*E. klunzingerii*) dans nos échantillons « d'*E. fusca* » et que la morphologie ne distinguait pas, nous avons traité les spécimens issus de l'océan Indien comme étant de la même espèce que ceux échantillonnés dans le Pacifique. Ceci confirme, s'il en était besoin, que toute étude sur les traits d'histoire de vie d'une espèce ne doit être réalisée que lorsque l'on est certain de l'espèce sur laquelle on travaille.

De ce fait, dans l'article publié ci-après, la totalité du jeu de données utilisé pour l'étude d'otolithométrie sera à lire en tenant compte de ce que nous venons de voir dans les chapitres précédents *i.e.*, tous les spécimens échantillonnés dans l'océan Pacifique sont des *E. fusca* et que sur la totalité des spécimens de l'océan Indien, issus de Mayotte et de La Réunion, sont des *E. klunzingerii*, exceptés 2 spécimens parmi les 12 issus de La Réunion qui sont des *E. fusca* (*i.e.*, les spécimens n°11823 et 11825).

Néanmoins, nous verrons, en conclusion de ce chapitre, que bien que les deux espèces aient été traitées comme une seule et même entité, les résultats n'en sont pas affectés.

**Étude de l'histoire migratoire et de la durée de la phase larvaire d'*Eleotris fusca*
(Gobioidei: Eleotridae), une espèce à large répartition dans l'Indo-Pacifique, à travers
l'analyse des otolithes.**

Article publié dans Cybium 2015, 39(4): 249-260

Résumé – *Eleotris fusca* est une espèce de poisson amphidrome colonisant les milieux insulaires de l'Indo-Pacifique. Son cycle de vie est caractérisé par une phase larvaire marine lui permettant de disperser dans l'océan et ensuite de recruter dans les rivières d'îles plus éloignées. Dans le but de comprendre l'histoire migratoire ainsi que la durée de la phase larvaire (DPL), des analyses microchimiques et microstructurales des otolithes ont été réalisées sur 100 spécimens collectés dans les rivières de quatre zones : Mayotte, La Réunion (océan Indien), Vanuatu et Polynésie française (océan Pacifique). Les variations des ratios de Sr:Ca ont été observées le long des otolithes en utilisant un couplage ablation laser femtosecondes-spectromètre de masse à plasma induit (fs-LA-ICP-MS). La variation du ratio Sr:Ca nous a permis de reconstruire les mouvements migratoires des poissons entre l'eau de mer (Sr:Ca élevé) et l'eau douce (Sr:Ca faible), et de valider le cycle amphidrome d'*Eleotris fusca*. Avec l'analyse microstructurale, nous avons observé que les DPL dépendaient du site d'échantillonnage. Dans l'océan Pacifique, la DPL est similaire entre le Vanuatu (moyenne \pm écart type : $90 \pm 19,2$ jours) et la Polynésie française ($96,2 \pm 17,5$ jours) alors que pour l'océan Indien, nous observons une différence significative entre Mayotte ($63,3 \pm 11$ jours) et La Réunion ($114,8 \pm 21,8$ jours).

Amphidromous life cycle of *Eleotris fusca* (Gobioidei: Eleotridae), a widespread species from the Indo-Pacific studied by otolith analyses

Published in Cybium 2015, 39(4): 249-260

Abstract – *Eleotris fusca* is a widespread amphidromous fish found in the Indo-Pacific area. Its life cycle is characterised by a marine pelagic larval phase allowing the species to disperse in the ocean and then to recruit to remote island rivers. In order to examine its migratory history and pelagic larval duration (PLD), otolith microchemical and microstructural analyses were undertaken on 100 specimens collected in the rivers of four areas: Mayotte, Reunion Island (Indian Ocean), Vanuatu and French Polynesia (Pacific Ocean). Variations of Sr:Ca ratios were observed along the otoliths using a femtosecond laser ablation-inductively coupled plasma spectrometer (fs-LA-ICP-MS). The variation of the Sr:Ca ratio allowed us to reconstruct fish migratory movements between sea water (high Sr:Ca) and freshwater (low Sr:Ca), and led us to assume that *Eleotris fusca* is an amphidromous species. Using microstructural analysis, we observed that the PLD depended on the sampling site. In the Pacific Ocean, the PLD is similar in Vanuatu (mean \pm SD: 90 ± 19.2 days) and French Polynesia (96.2 ± 17.5 days) whereas a significant difference emerged in the Indian Ocean between Mayotte (63.3 ± 11 days) and Reunion Island (114.8 ± 21.8 days).

Key words: Eleotridae, *Eleotris fusca*, Indo-Pacific, Amphidromy, Pelagic larval duration, Otolith analysis

Running title: Amphidromous life cycle of *Eleotris fusca*

Introduction

Insular river systems of the Indo-Pacific area are mostly inhabited by amphidromous species (teleost fish, crustaceans and molluscs). These species are the biggest contributors to the diversity of freshwater communities (Nelson et al. 1997, Keith et al. 2007, Watson et al. 2007, Keith & Lord 2011). Two fish families are predominant: Gobiidae and Eleotridae (Gobioidei). These gobioids spawn in freshwater. After hatching, free embryos drift downstream to the sea, where the pelagic larval phase takes place. After this marine pelagic phase, which extends nearly from three to nine months (Radtke et al. 1988, Maeda et al. 2007, Yamasaki et al. 2007, Iida et al. 2008, Lord et al. 2010), individuals (post-larvae) return to rivers (recruitment phase) to grow and reproduce. Such a life cycle is called amphidromous. Sometimes, the biomass of larvae migrating upstream is so great that they become a major source of food for local human populations in the Indo-Pacific and Caribbean areas (*e.g.* Reunion Island and Vanuatu) (Bell 1999, Keith 2003). This food resource is probably unsustainable considering the complexity of the gobioid life cycle and the lack of fisheries management.

Eleotris fusca (Bloch & Schneider, 1801) (Eleotridae) is a widespread species found in the Indo-Pacific area, from the Western Indian Ocean to New Caledonia, Vanuatu and French Polynesia (Keith et al. 2006, 2010, 2013). In insular rivers, it is a common carnivorous species distributed primarily in freshwater (Maeda & Tachihara, 2004, 2006). This species is euryhaline and is found in brackish waters, but mainly in the lower part of freshwater areas. It prefers to be close to the riverbank where the current is slow, or in the lentic zones (Keith et al. 2010).

The life history of some *Eleotris* (*E. melanosoma* Bleeker 1853, *E. acanthopoma* Bleeker 1853, as well as *E. fusca*) in Pacific area has been relatively studied with, for example, reproduction and early development (Maeda et al. 2008), downstream migration (Maeda & Tachihara 2010, Yamasaki et al. 2011), pelagic larval duration (Maeda et al. 2007, Shiao et al. 2015), recruitment (Maeda & Tachihara 2005, Shiao et al. 2015) and feeding habits (Resh et al. 1999, Maeda & Tachihara 2004). But generally, these studies were done at a local or regional scale.

In tropical islands, especially in Reunion Island, *E. fusca* undergoes pressures linked to the loss of the hydrological corridor and the habitat degradation. If the threats on this species were not clearly identify at the international scale due to a lack of investigations, the association

of the habitat loss and fisheries in the Reunion Island lead the IUCN France to classify *E. fusca* as “Endangered” on the red List of Endangered Species in France (IUCN France et al. 2013). Because of its role in the freshwater ecosystem and the fishing of its post-larvae, it is important to understand the life cycle of this species to implement conservation measures.

Fish otoliths are calcified structures located in the inner ear of the fish. They usually show a series of growth structures formed on a daily basis called increments (Pannella 1971). The otoliths are acellular, metabolically inert (Campana 1999) and do not undergo any mineral resorption or alteration (Campana & Thorrold 2001). Because of these characteristics, otoliths are used to reconstruct many details about the fish physiological and environmental past. Therefore, microstructures are used to accurately estimate fish age and to analyse and date specific events such as recruitment, metamorphosis or reproduction (Lecomte-Finiger 1999, Radtke et al. 2001, Shen et al. 1998). For amphidromous species, a check mark is formed at recruitment on the otolith when larvae enter the estuaries and start to colonise the rivers (Shen et al. 2002, Keith et al. 2008). This mark allows to easily distinguish the marine larval phase from the juvenile and adult phases in freshwater. Daily increments from the core to the check mark are therefore an estimation of the pelagic larval duration (Yamasaki et al. 2007, Taillebois et al. 2012). The otolith matrix is also able to trap minor and trace elements coming from the surrounding water and food. The otolith elemental composition is widely used for the reconstruction of the migratory and the environmental history of fish (Daverat et al. 2005, Shiao et al. 2006, Arai et al. 2007, Lord et al. 2011). Indeed, the strontium:calcium ratio (Sr:Ca) is used to reconstruct the migratory movements of diadromous fish between sea water and freshwater (Milton et al. 2008, Tabouret et al. 2010, Feutry et al. 2011, 2012). For amphidromous species, elevated Sr:Ca ratios in fish otoliths are widely accepted as proof of occupation of marine habitats (Howland et al. 2001, Crook et al. 2006) or of a marine larval stage (Closs et al. 2003), as opposed to low Sr:Ca ratio, which reflects occupation of freshwater habitats.

The aim of our study was to investigate, for the first time on a large scale, the life history traits and pelagic larval duration of the widespread species *Eleotris fusca* collected in four areas (Vanuatu and French Polynesia in Pacific Ocean and, Reunion Island and Mayotte in Indian Ocean) through the otolith microstructure and microchemistry. Firstly, we studied the elemental composition of the otolith to investigate the nature of the amphidromous life cycle of the species

and secondly, we estimated the pelagic larval duration (PLD) and the larval growth, using the daily increments of the otoliths.

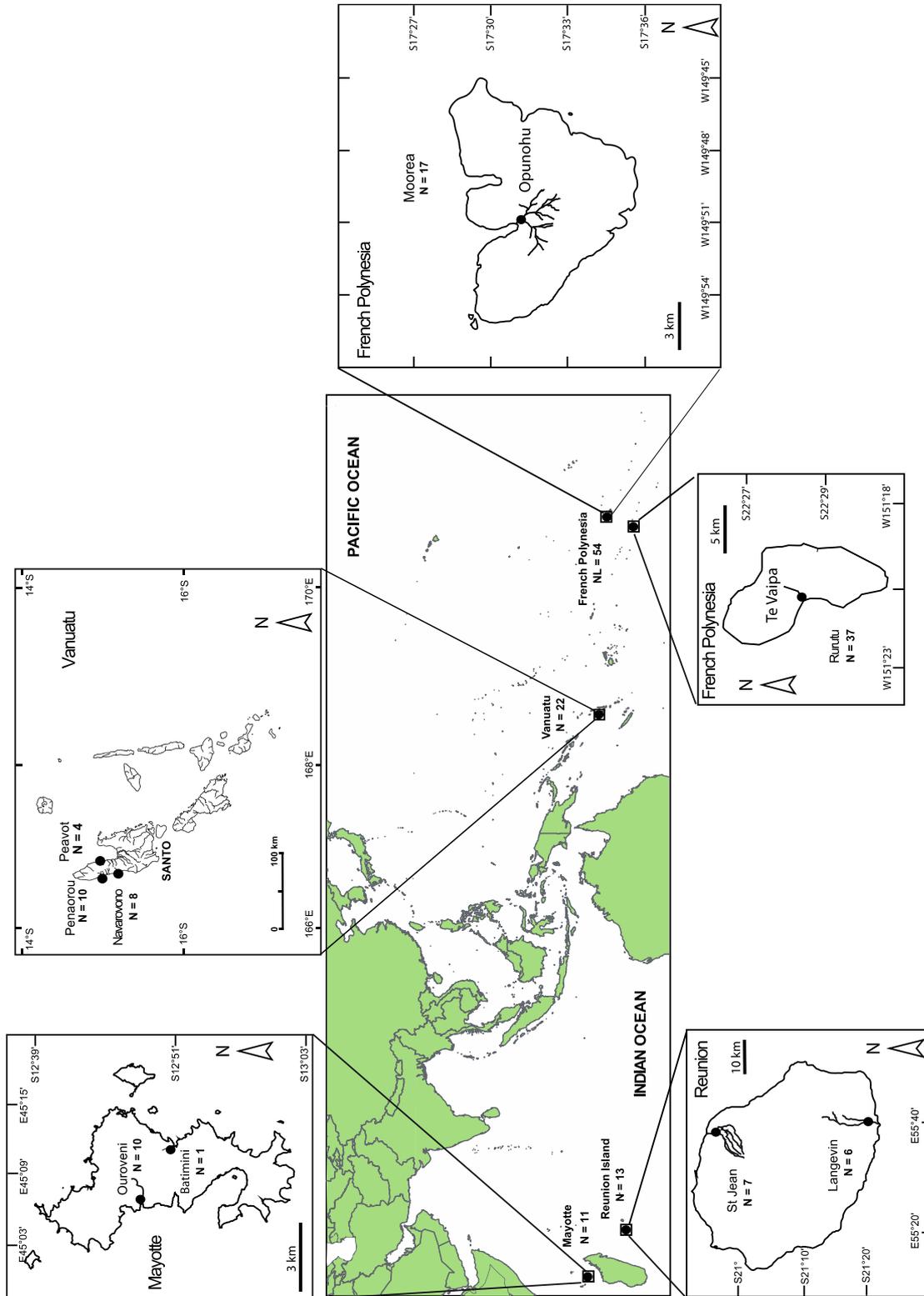


Figure 1. Sampling locations of *Eleotris fusca* in the rivers (●) of 4 sites (■) in the Indo-Pacific: Mayotte (N = 11), Reunion Island (N = 13), Vanuatu (N = 22) and French Polynesia (N = 54)

Table 1. Sampling locations in the 4 countries and number (N) of *Eleotris fusca* specimens used for the standard length (N_{SL}), the marine pelagic larval duration estimation (N_{PLD}) and for the microchemistry analysis. SL: Standard Length; PLD: Pelagic Larval Duration; SD: Standard Deviation

Ocean	Location country/island	River	Date	N	N per site	SL (mean mm ± SD)	N _{SL}	PLD for each country (mean days ± SD)	PLD for each ocean (mean days ± SD)	N _{PLD}	Otoliths used for microchemistry analysis
Pacific (N=76)	Vanuatu - Santo	Navarovono	Nov. 2007	8							
	Vanuatu - Santo	Penaorou	Nov. 2006	10	22	54.4 ± 7.6	13	90.0 ± 19.2		20	11
	Vanuatu - Santo	Peavot	Nov. 2006	4		range [31.4 - 69.1]		range [57 - 130.5]	93 ± 18.4		
French Polynesia - Moorea	French Polynesia - Rurutu	Opunohu	June 2007	17		61.6 ± 13.3	25	96.2 ± 17.5		19	15
		Tè vaipa	July 2007	37	54	range [35.7 - 88.7]		range [62 - 131.5]			
						Total N _{LS} = 38		Total N _{PLD} = 39		Total N = 26	
Indian (N=24)	Mayotte	Batimimi	Nov. 2003	1							
	Mayotte	Ouroveni	April 2009	3	11	61.8 ± 17.4	11	63.3 ± 11		10	4
	Mayotte	Ouroveni	May 2006	7		range [42.7 - 82.4]		range [38 - 78]	91.4 ± 31.5		
	Reunion	Saint Jean	March 2007	7		64.5 ± 14.1	13	114.8 ± 21.8		12	5
		Langevin	November 1998	6		range [44.5 - 83.2]		range [82.5 - 141]			
					Total N _{LS} = 24		Total N _{PLD} = 22		Total N = 9		

I. Materials & Methods

1. Sampling and measurement

One hundred specimens were collected in the rivers of four areas distributed in the Pacific Ocean (Vanuatu and French Polynesia) and the Indian Ocean (Mayotte and Reunion Island) (Fig. 1) using a DEKA 3000 electrofishing system (Gerätebau, Marsberg, Germany). Due to the threatened status of the species in the Indian Ocean (Endangered in Reunion Island, IUCN FRANCE et al. 2013), fewer specimens have been collected in this area. All the fish were sampled in the lower part of the freshwater streams, as defined by Keith et al. (2013), at 5-50 m depth. Fish were put to sleep and killed using an overdose of clove essential oil (10%), then stored and preserved in 95% alcohol. The standard length (N = 62) was measured using a dial caliper (Mitutoyo) (Tab. I).

2. Otolith preparation and estimation of the PLD

Pairs of sagittal otoliths were extracted from fish under a binocular stereomicroscope (Olympus VZ), rinsed in distilled water and dried. Otoliths were individually embedded in epoxy resin (Araldite 2020, Escil, France). For each specimen, one of the otoliths was ground on a transverse section down to the core, using carbide silicon abrasive discs of decreasing grain size (Escil, France). The embedded otolith was polished with alumina paste (Escil, France) and thoroughly rinsed in MilliQ water. Preparations were finally dried and kept in dry clean tubes. Otolith microstructure observations were made under an Olympus BX51 light microscope; each otolith was photographed with an Olympus DP20 digital camera. According to previous studies that validated the daily accretion growth of fish, especially *Eleotris* (Maeda et al. 2007), or amphidromous gobies (Yamasaki et al. 2007, Iida et al. 2010a, Taillebois et al. 2012), we assumed that the otolith increments of *E. fusca* were formed on a daily basis. The first increment after the core is assumed to occur at hatching (Lecomte-Finiger 1999). To estimate the PLD, the daily increments were counted from the core to the check mark (Fig. 2). For each otolith, two readers independently counted the number of increments. Pannela (1971) showed that the growth of the otolith reflects the metabolism of the fish and, therefore, its growth. So, we assumed that the otolith growth rate from the core to the check mark represents the larval growth of the individual. The mean growth rate of the otolith ($\mu\text{m}/\text{day}$) during the marine larval phase

was calculated using *AnalySIS* work 5.0 software (Olympus, Germany) by measuring the distance (μm) every 10 daily increments from the core to the check mark along the longest radius (Fig. 3).

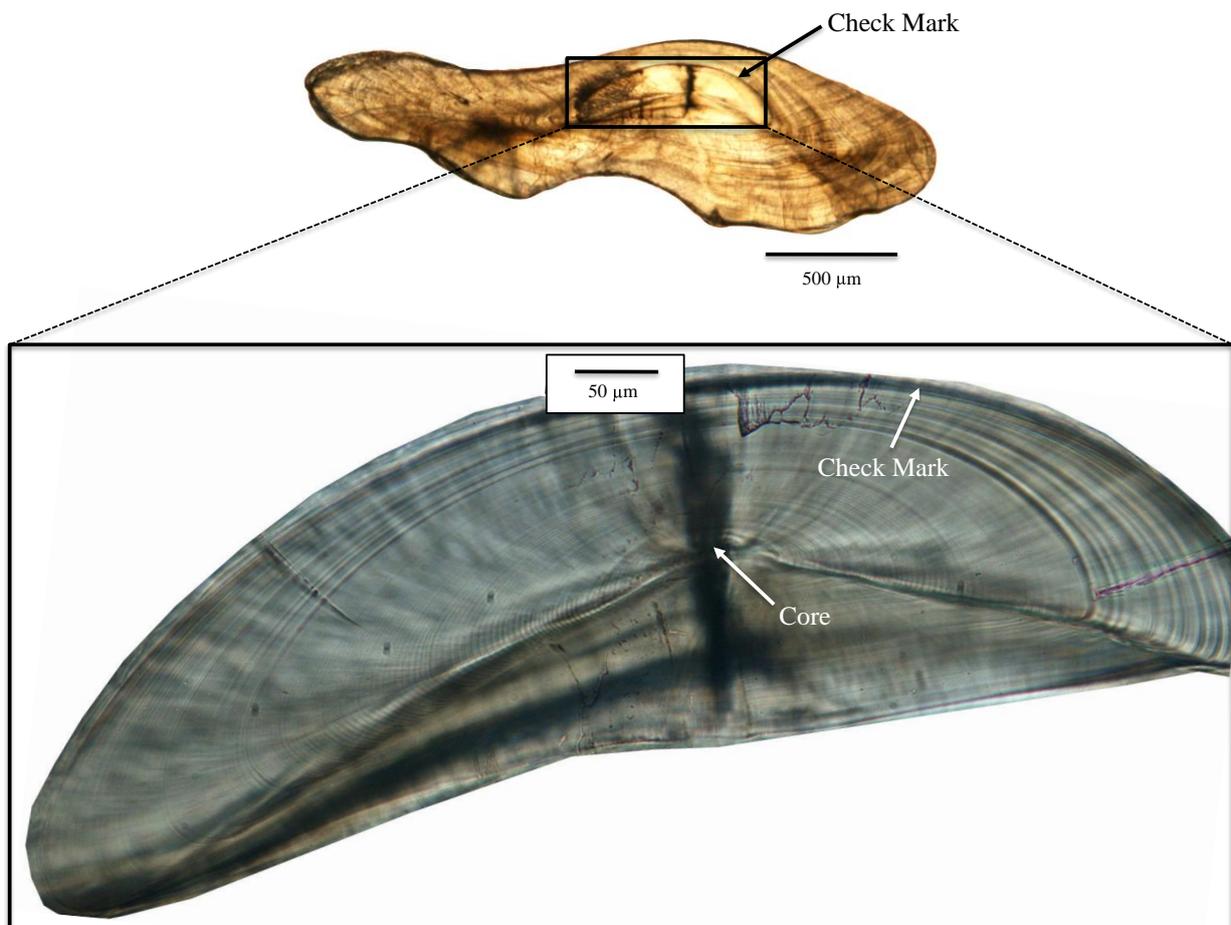


Figure 2. The first picture is a transverse section of sagittal otolith of an *Eleotris fusca* from French Polynesia. The second one is a magnification of the marine larval phase *i.e.*, the area included between the core and the check mark.

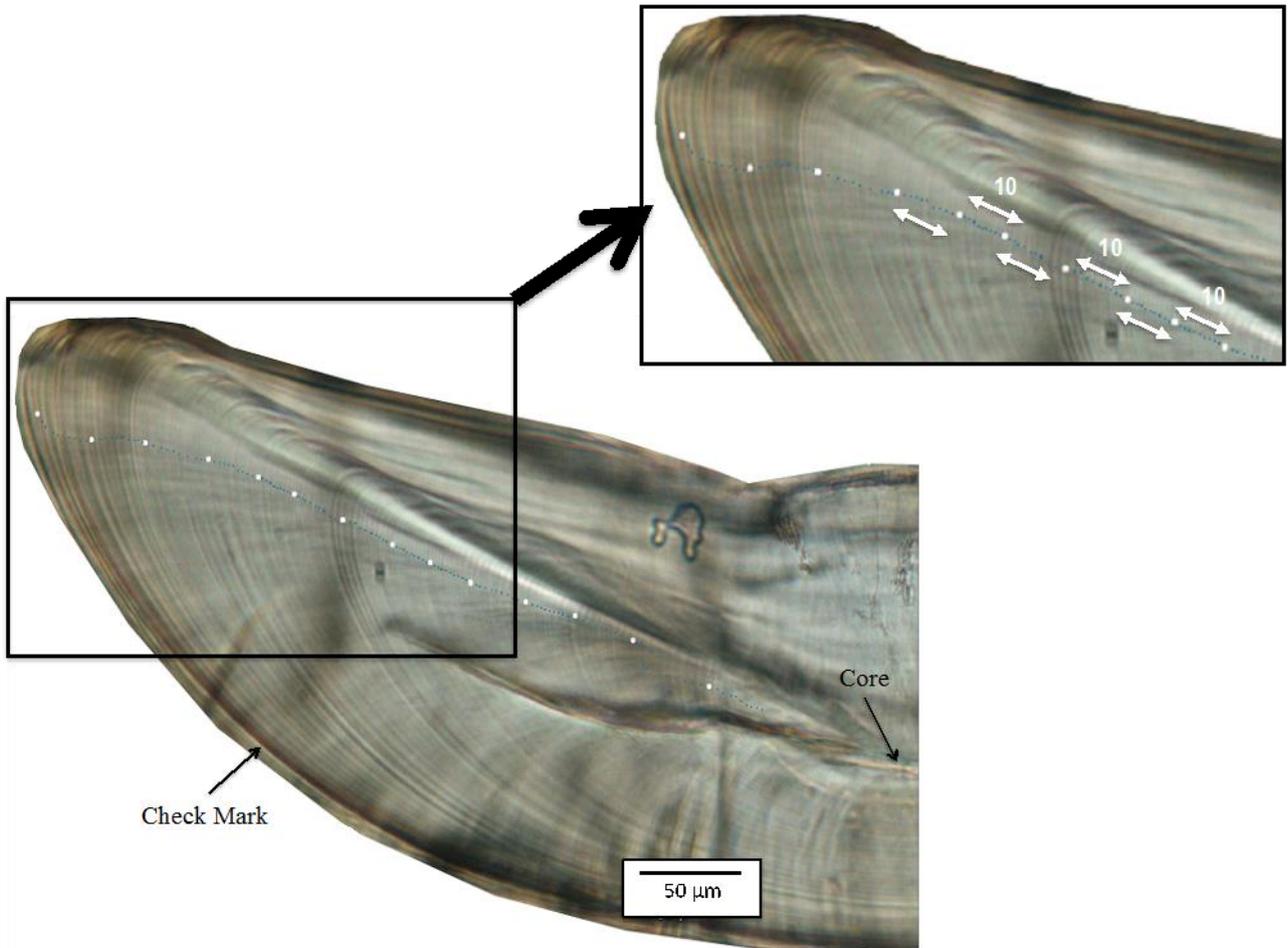


Figure 3. *Eleotris fusca* otolith growth rate analysis: white dots every 10 daily increments.

3. Microchemical analysis

Eleven otoliths from Vanuatu, fifteen otoliths from French Polynesia, five from Reunion Island and four from Mayotte were analyzed with an IR 10130 nm femtosecond laser (Alfamet-Novalase, France) coupled to an Elan DRC II (Perkin Elmer) inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICPMS). A linear raster scan ablation 20 μm width was made along the longest radius of the otolith. The ablation started 70 μm before the core and ended at the otolith edge passing through the core and the check mark. The laser beam was applied with a 500 Hz frequency at a speed of 5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Ablation conditions were described in previous studies on Gobiidae species (Lord et al. 2011, Tabouret et al. 2011). ^{43}Ca was used as an internal standard for each ablation to check for variation in ablation yield. Quantification of ^{86}Sr concentration was allowed using three certified reference glasses: NIST614, NIST612 and NIST610 (National

Institute of Standards and Technology, USA). Analytical accuracy was achieved with the fish certified otolith reference material NIES22 (National Institute for Environmental Studies, Japan). Strontium was standardized to calcium (*i.e.*, Sr:Ca) based on the stoichiometry of calcium carbonate (380,000 $\mu\text{g Ca g}^{-1}$ otolith), as this element can substitute for calcium in the otolith matrix (Campana 1999). The average detection limit based on three standard deviations (SD) of the blank gas was 3.28 $\mu\text{g.g}^{-1}$ for ^{86}Sr *i.e.*, 0.86×10^{-5} .

4. Statistical analysis

The data was statistically processed using the free *R software* (version 3.0; R Development Core Team, 2014). First, the normality of the data was systematically verified using Shapiro-Wilks normality test, allowing us to choose between parametric and non-parametric tests. In order to test whether larval and pelagic phase were different, the Sr:Ca values for each island were compared between the pelagic larval phase and the freshwater phase using a Kruskal-Wallis test and, for each individual, using a pair-sample Wilcoxon or Student test. In order to test the PLD estimated by the two readers, a paired-t test was performed. A one-way ANOVA was used to compare PLDs among the four sampling PLD. With a Student test, we compared PLD between the two oceans, and within each ocean: Indian (Mayotte-Reunion Island) and Pacific (Vanuatu-French Polynesia). The relationship between the standard length and the longest radius of otoliths was tested with a Spearman test. Then, the total growth rate of the otolith in the four areas was tested with a Kruskal-Wallis test. For each test the Bonferonni correlation was applied to avoid any error due to the repetition of analyses.

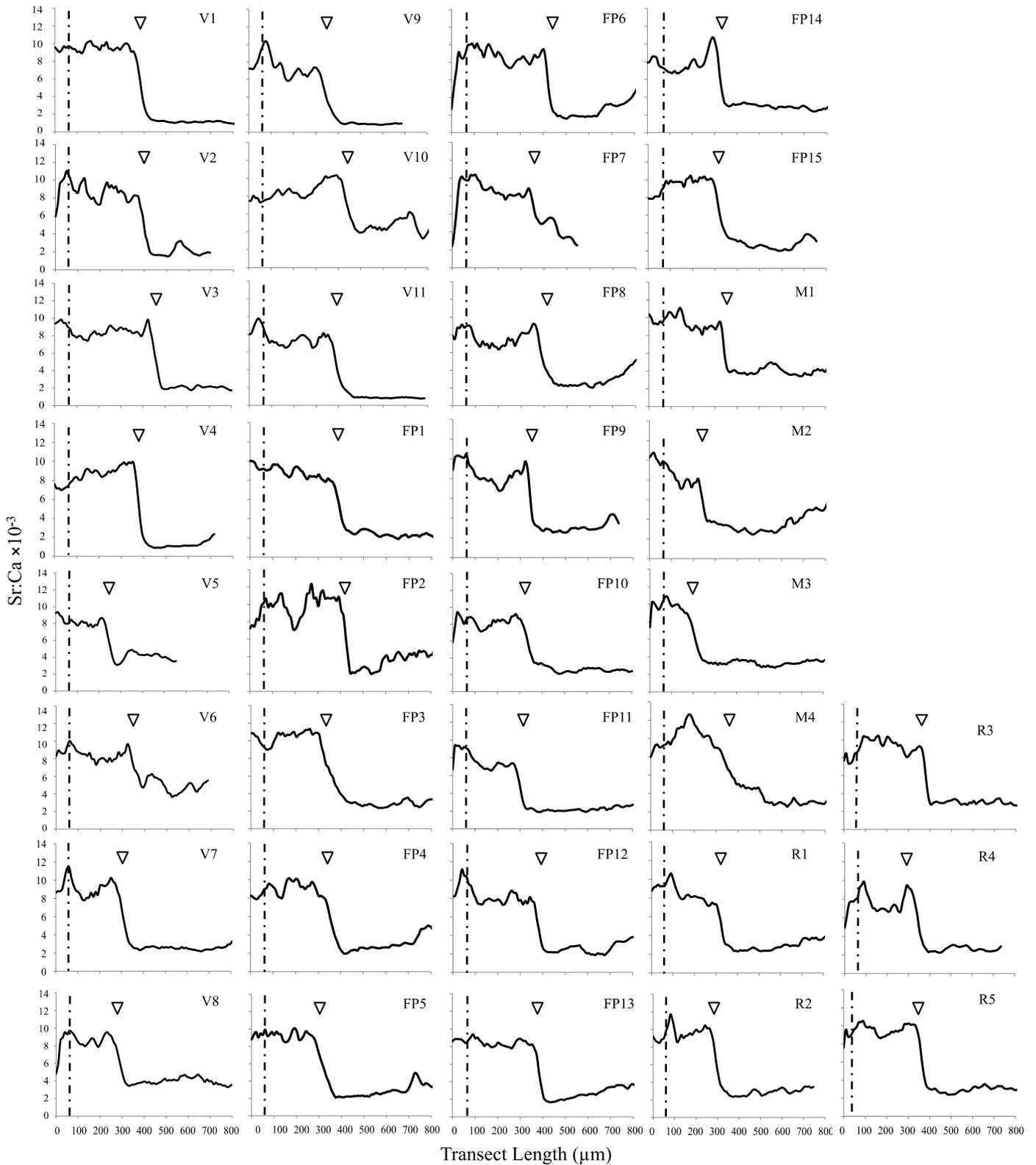


Figure 4. Sr:Ca profiles (black line) provided by fs-LA-ICP-MS on otoliths of *Eleotris fusca* from Vanuatu (V1 to V11), French Polynesia (FP1 to FP15), Mayotte (M1 to M4) and Reunion Island (R1 to R5). Dotted line: core; White triangle: check mark.

II. Results

Considering the reading difficulty of some otoliths, not all otoliths were used for the analyses. Sixty-one were used for the PLD and 35 for the microchemistry (Tab. I).

1. Otolith Sr:Ca ratios

For all individuals of *Eleotris fusca* used for microchemical analyses (N = 35), the Sr:Ca ratios show the same pattern ($p > 0.4$ for each site). The Sr:Ca ratio is high and constant during the marine pelagic larval phase, i.e. from the core to the check mark, with mean values of (mean \pm SD) $8.55 \pm 0.59 \times 10^{-3}$, $8.75 \pm 0.78 \times 10^{-3}$, $8.89 \pm 0.83 \times 10^{-3}$, $9.57 \pm 0.62 \times 10^{-3}$ for Vanuatu (individual V1 to V11), French Polynesia (individual FP1 to FP15), Reunion Island (individual R1 to R5) and Mayotte (individual M1 to M4) specimens, respectively (Fig. 4). Then, it decreases drastically at the check mark and reaches a lower ratio of $2.94 \pm 1.34 \times 10^{-3}$ for the individuals from Vanuatu, $3.38 \pm 0.55 \times 10^{-3}$ for those from French Polynesia (N = 26, $p < 0.001$) and, to $3.37 \pm 0.12 \times 10^{-3}$ for samples from Reunion Island and $4 \pm 0.34 \times 10^{-3}$ for Mayotte (N = 9, $p < 0.001$).

2. PLD Estimation

Since there was no significant difference in the age at recruitment between the two independent readers ($t = -1.5607$, $p = 0.1249$), we used the mean of the two readings to have the best PLD estimation. PLDs in the four areas were analysed by a one-way ANOVA and it revealed that at least one locality among the four showed a significantly different PLD ($p < 0.001$). Moreover, a Student test indicated that mean PLDs are similar between Pacific (mean \pm SD: 93.0 ± 18.4 days) and Indian oceans (91.4 ± 31.5 days) ($t = -0.2171$, $p = 0.8296$). The same result was obtained when we compared Vanuatu (90.0 ± 19.2 days [range of: 57-130.5 days]) and French Polynesia (96.2 ± 17.5 days [62-131.5 days]) ($t = -1.0551$, $p = 0.2982$). However, there is a significant difference between Mayotte (63.4 ± 5.8 days [38-78 days]) and Reunion Island (114.8 ± 21.8 days [82.5-141 days]) specimens in the Indian Ocean ($t = -6.7752$, $p < 0.001$).

In other terms, the pelagic larval duration depends on the sampling site. The Pacific Ocean PLD appears homogenous whereas significant differences emerge in the Indian Ocean between Mayotte and Reunion Island (Tab. I).

3. Otolith growth

According to the Spearman test, there is a significant relationship between the standard length and the longest radius of otoliths ($N = 62$, $S = 8360$, $p < 0.0001$; $r^2 = 0.69$). For all site, the same pattern occurs (Fig. 5): the otolith growth rate is high during the first 10 days of the larval life (mean \pm SD: 6.79 ± 1.57 $\mu\text{m}/\text{day}$ for Vanuatu; 6.43 ± 2.11 $\mu\text{m}/\text{day}$ for French Polynesia, 8.25 ± 5.17 $\mu\text{m}/\text{day}$ for Mayotte and 6.51 ± 1.79 $\mu\text{m}/\text{day}$ for Reunion Island), then it decreases drastically (4.26 ± 0.72 $\mu\text{m}/\text{day}$ for Vanuatu; 3.38 ± 1.26 $\mu\text{m}/\text{day}$ for French Polynesia, 4.97 ± 2.13 $\mu\text{m}/\text{day}$ for Mayotte and 2.91 ± 0.6 $\mu\text{m}/\text{day}$ for Reunion Island) between the 10th and the 20th day, and more gradually from the 20th day to the recruitment mark (around 2.7 $\mu\text{m}/\text{day}$). A Kruskal-Wallis test showed that the total growth rate from the core to the check mark of the otolith changes with a similar pattern in the four areas ($N = 37$, $\chi^2 = 12$, $p = 0.4457$).

III. Discussion

1. Otolith Sr:Ca

Whatever the island considered, microchemical analysis of *Eleotris fusca* otoliths revealed high Sr:Ca ratios from the core (hatching) to the check mark and low values after the check mark to the edge of the otolith.

We know that individuals were caught in freshwater, so we used the Sr:Ca values at the otolith edge as a reference to characterise the Sr:Ca in freshwater *i.e.*, values under 2×10^{-3} . Sr:Ca ratios from the check mark to the core of the otolith are higher than those of the edges ($8.55 \pm 0.59 \times 10^{-3}$ to $9.57 \pm 0.62 \times 10^{-3}$), suggesting that these values indicate an area with high salinity (estuary and ocean). Such elevated ratios in fish otoliths are widely accepted as a marine fingerprint (Tzeng 1996, Tsunagawa & Arai 2009, Tabouret et al. 2010) and the decrease of Sr:Ca ratio ($2.94 \pm 1.34 \times 10^{-3}$ to $4 \pm 0.34 \times 10^{-3}$) always coincides with the check mark *i.e.*, when individuals enter rivers. This pattern and the values observed were usually

found for other amphidromous species like *Sicyopterus lagocephalus* (Pallas, 1770) (high Sr:Ca values: $10\text{-}12 \times 10^{-3}$ and low values: $2\text{-}4 \times 10^{-3}$) (Lord et al. 2011), *Sicydium punctatum* Perugia, 1896 ($9.39 \pm 0.50 \times 10^{-3}$ and $2\text{-}4 \times 10^{-3}$) (Tabouret et al. 2011) or other Gobiidae (Radtke & Kinzie 1996, Chang et al. 2006, Taillebois et al. 2015). *E. fusca* is generally known as amphidromous (Keith et al. 2010, 2013). Maeda & Tachihara (2004, 2005) have demonstrated the amphidromy of this species in Japan. On the other hand, it was considered as an estuarine species by several authors (*e.g.*, Kuo & Shao 1999, Vivier et al. 2010). However, the results of our study on otolith microchemistry support the amphidromy of *E. fusca* on all sites studied.

After the check mark *i.e.*, during freshwater life, the Sr:Ca ratio is relatively stable, except for some profiles such as Vanuatu individual V2, French Polynesian individual FP2 or Mayotte individual M2 (Fig. 4), where we observed a slight increase. Some physiological processes are known to leave a chemical mark on the otolith, such as stressful events and reproductive activity, both in the form of elevated Sr:Ca ratios (Campana 1999). The ability of some individuals to move from freshwater habitats to brackish, or in some parts of the river, could explain the slight fluctuation of Sr:Ca observed (Lord et al. 2011). Indeed, Maeda & Tachihara (2004) showed that in the Teima River (Okinawa, Japan) *E. fusca* is distributed from the upper limit under tidal influence area to freshwater area. This distribution might explain why certain profiles present some Sr:Ca variations. Moreover, elemental concentration in tropical rivers or estuaries can be modified by extreme climatic and hydrological seasonal variations or by sediment loads or river flows (Tabouret et al. 2011). But attributing a particular event to a peak or a particular variation of the ratios is difficult without a good knowledge of the event (*e.g.*, Fig. 4. V2).

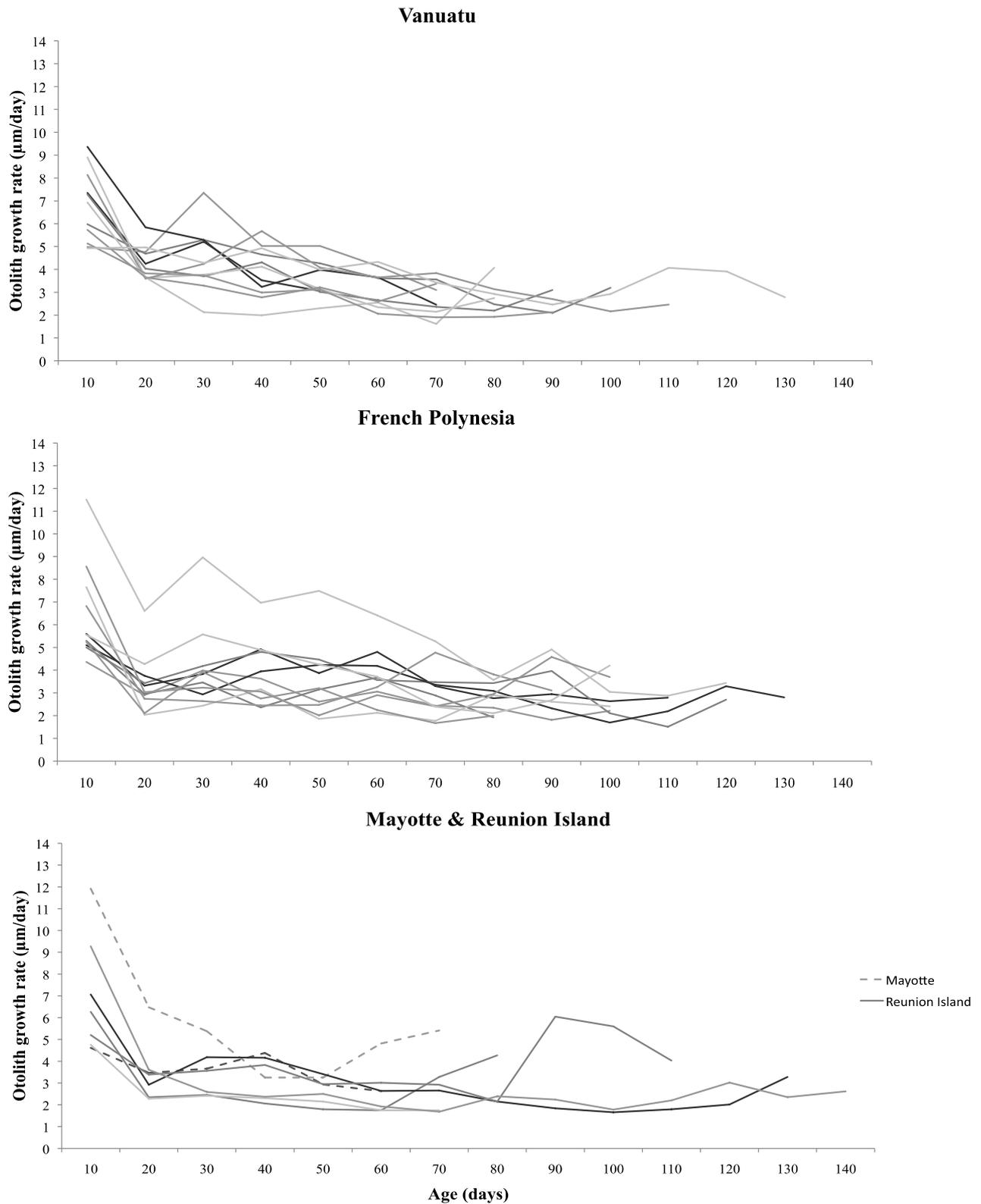


Figure 5. Otolith growth rate ($\mu\text{m}/\text{day}$) from the core to the check mark as a function of age (days) for the Vanuatu, French Polynesia, Mayotte and Reunion Island samples. The age 0 is assumed to correspond to hatching (core) and the older age to the recruitment check mark. (Each color represents a specimen)

2. Duration of the pelagic larval phase (PLD)

Some studies have been conducted on the PLDs of Eleotridae and found similar results. Sirot (2009) found PLD around 75 ± 17.24 days ($N = 36$) for *Eleotris perniger* (Cope, 1871), a species in Guadeloupe (French West Indies). In Dominica, the age at recruitment of *E. pisonis* (Gmelin, 1789) ($N = 21$) was about 80 to 160 days (Bell et al. 1995). Maeda et al. (2007) found for *E. fusca*, *E. melanosoma* and *E. acanthopoma* PLDs around two to four months in Okinawa Island, Japan. Moreover, Shiao et al. (2015) obtained a PLD of about 84-111 days ($N = 12$) for *E. fusca* in Taiwan and Corbarieu (2008) found 150 ± 17.24 days ($N = 82$) in Reunion Island. But all these studies focused on a small geographical scale (one island).

In this present study, we focused on a larger scale (four islands in two oceans). We showed that, depending on the area, the pelagic larval duration of *E. fusca* individuals is not the same and is highly variable. Significant differences were found in the Indian Ocean; PLD varied by means of two between the studied islands, Mayotte (63.4 ± 5.8 days; [38-78 days]) and Reunion Island (114.8 ± 21.8 days; [82.5-141 days]), although ranges of standard length are similar. On the contrary, both PLD and standard length ranges are similar for Vanuatu (90 ± 19.2 days; [57-130.5 days]) and French Polynesia (96.2 ± 17.5 days; [62-131.5 days]) in the Pacific Ocean (Tab. I).

Some studies showed that PLD could vary with the season (McDowall et al. 1994, Bell et al. 1995, Radtke et al. 2001, Maeda et al. 2007, Teichert et al. 2014). These studies revealed that short PLDs and high growth rates were generally observed during the warmer season. This phenomenon may explain the PLD difference in the Indian Ocean. Indeed, in Reunion Island, Corbarieu (2008) showed that there is a significant difference in the age at recruitment for *E. fusca* (i.e., in PLDs). When the individuals were born in summer (hot [25-27°C, mean: 26°C] and humid season), between November and April, the PLDs were shorter (110 ± 14 days; [76-128 days]; $N = 30$) than those born in winter (cool [24-27°C, mean: 25°C] and dry season), between May and October (193 ± 22 days; [152-228 days]; $N = 23$). On the same island, Teichert et al. (2014) showed similar results for *Sicyopterus lagocephalus*: PLDs and size are related to the hatching date, showing that the seasonal effect was the main component of variability for these two parameters. Indeed, the youngest and smallest post-larvae (short PLDs) hatched from November and January (summer) and recruited from March and May, whereas the oldest and largest (high PLDs) hatched between June and

August (winter) and recruited in January-March. There is the same seasonality in Mayotte but the sea surface temperatures (SST), recorded around Mayotte from the NOAA's Coral Reef Watch Program's satellite (<http://coralreefwatch.noaa.gov/satellite/index.php>) for the two seasons, are higher than around Reunion Island (*i.e.*, 27-29°C in summer, mean: 28°C and 26-29°C in winter, mean: 27°C); this could explain why the PLDs are shorter in Mayotte, whatever the season, compared to Reunion Island.

The pluviometry, which varied according to the season, can also effect the pelagic larval duration. Indeed, the heavy rain in summer seems to be associated with two important life stages: the drift to the sea of the newly hatched larvae and the recruitment of marine post-larvae in freshwater. The increase of freshwater flows in the season may help newly hatched larvae to drift downstream to sea sooner, and these flows seem to trigger the post-larvae migration inland (Keith, 2003).

The seasons seem to have a major impact on the PLD with the difference of SST and the variability of the freshwater flow. But according to Grant and Bowen (1998), the larval dispersal could be subject to numerous physical barriers such as the depth, the salinity, the gyres and the current patterns (Borkin 1991, Hare & Cowen 1996, Murphy & Cowan 2007). And larvae could also actively swim in the sea as described in gobiids (Balon & Bruton 1994, Leis & McCormick 2002, Iida et al. 2010b). All of these may have an impact on the PLD.

The distance and the difficulty to reach some islands may lead to longer PLDs and increase the probability of a suitable stream for recruitment (Radtke & Kinzie 1996, Keith 2003). In the widespread amphidromous species *S. lagocephalus*, as it is the case for *E. fusca*, PLDs in Pacific islands are shorter (130 ± 3.4 days; Lord et al. 2010) than those of Reunion Island (201 ± 40 days, Hoareau, 2005; 170.4 ± 43.7 days, Teichert, 2014). Thus, it seems that Reunion Island is submitted to special current conditions. Indeed, the island appears to be isolated by the anticyclonic subtropical gyre in the South-Western Indian Ocean (Wyrcki 1973). Larvae emitted from Reunion Island or from Maurice Island may stay in the sea for a longer period of time, which would explain increased PLDs. Moreover, the percentage of auto- and allo-recruitment is unknown but we know that there is gene flow between Indian islands (Mennesson, unpubl. data).

Nevertheless, more studies are needed to explain these results. A phylogeographic study on the populations of *E. fusca* would bring insights into the dispersal of the species.

3. Otolith growth

For all the samples, during growth, pattern is observed for all fish during the larval phase. Indeed, no significant difference in the otolith growth rate ($\mu\text{m}/\text{day}$) was detected between the four sites and between both oceans (Fig. 5). The otolith growth reflects the fish growth and evolves according to three phases. During the first phase (first 10 days), the growth is rapid (e.g. Vanuatu individuals: $6.79 \pm 1.57 \mu\text{m}/\text{day}$); then in the second phase, it drops 10 days after ($4.26 \pm 0.72 \mu\text{m}/\text{day}$) and decreases gradually (3.93 to $2.5 \mu\text{m}/\text{day}$) in the third phase (from the 30th day), until it reaches a plateau. These phases might be related to the morphological and physiological modifications of larvae during the marine phase (Valade 2001, Keith et al. 2008). However, the timing of the first deposition is not yet known for *Eleotris fusca* and it may also have several days lag. But it is generally known for a lot of fish species that the first increment is deposited during their first feeding when the larva has completed yolk absorption (Brothers et al. 1976, Laroche et al. 1982, Tzeng & Yu 1988) but it needs to be studied for *E. fusca*. Maeda et al. (2008) studied the reproductive biology and the early development of *E. fusca*. This study showed that embryos spend more than 24 hours in their egg and that the yolk sac decreases the first day after hatching and disappears the fourth day under rearing condition. The mouth and the pectoral fins begin to form the second day. On the third day the mouth is opened. Thus, the mouth is functional before the yolk sac is completely absorbed. In the sea, larvae are supposed to be planktonic and feeding on zooplankton, which is less energetic than the yolk sac; that could induce a decrease of growth rate after the first 10 days (Lord et al. 2010, Teichert et al. 2014).

It is important to specify that there is an individual variability in the otolith growth rate in amphidromous fish (Lord et al. 2010, this study). Some aspects and events might affect it, such as genetic or environmental variability like the food resources (Jones 1986, Cushing 1990) or water temperatures (McCormick & Molony 1995, Shafer 2000, Radtke et al. 2001), depending themselves on the seasons.

Conclusion

This study shows that *Eleotris fusca* is an amphidromous species with a high variability in the PLD according to the sampling localities. This variability illustrates the fact that *E. fusca* has a high plasticity in its pelagic larval duration and thus reveals an important adaptation capacity, according to the environmental conditions encountered. Nevertheless, amphidromous species are distributed along the river from the estuary to higher reaches according to their ecology. And it is important to allow species to move freely (no barriers) between downstream and upstream in the river and between the river and the sea. The success of such a life cycle depends highly on the management and the conservation of their habitats.

Acknowledgements

We would like to thank the Muséum national d'Histoire naturelle, Paris (DMPA and UMR BOREA), the Vanuatu Environment Unit (D. Kalfatak) and ARDA (Association Réunionnaise pour le Développement de l'Aquaculture). This study was possible with the assistance of the following colleagues: G. Marquet, P. Feutry, T. Robinet, P. Sasal, R. Galzin, M. Hautecoeur and C. Lord.

Conclusion sur l'étude d'otolithométrie

Cette étude a été réalisée avant la fin de l'analyse génétique et la découverte surprenante d'une espèce cryptique au sein du complexe *E. fusca*. Il n'y avait en fait que deux spécimens du vrai *E. fusca* (spécimens n°11823 et 11825 capturés à La Réunion)¹ dans le jeu de données consacré au spécimens de l'océan Indien mais ceci ne modifie en rien l'interprétation des résultats obtenus. En effet, la moyenne et l'écart type des DPL pour La Réunion était pour les deux espèces confondues de $114,8 \pm 21,8$ jours [82,5-141 jours], il en est en fait de $114,5 \pm 21,1$ jours [82,5-133,5 jours] pour les spécimens d'*E. klunzingerii* et seul l'individu n°11823 a été étudié en microchimie (Fig.4., R1), confirmant le cycle amphidrome du spécimen. Ainsi, les résultats de DPL obtenus sur les îles de Mayotte et de La Réunion ne concernent que l'espèce *E. klunzingerii*.

Etant donné le très faible nombre d'individus d'*E. fusca* échantillonnés dans l'océan Indien (2 sur 83 spécimens séquencés), cette dernière peut être considérée comme principalement située dans l'océan Pacifique. Finalement, compte tenu de la présence de 2 espèces dans nos analyses, les résultats sont suivants :

- 1. L'analyse microchimique permet de valider le cycle de vie amphidrome chez les deux espèces, *E. fusca* et *E. klunzingerii*.**
- 2. Aucune différence significative n'est trouvée entre les DPL des spécimens appartenant à *E. fusca* dans l'océan Pacifique et les DPL des spécimens d'*E. klunzingerii*.**
3. Dans l'océan Pacifique, au sein des *E. fusca*, les **DPL sont similaires** que les spécimens soient issus de la Polynésie Française ($96,2 \pm 17,5$ jours ; [62-131,5 jours]) ou du Vanuatu ($90 \pm 19,2$ jours ; [57-130,5 jours]).
4. Dans l'océan Indien, au sein des *E. klunzingerii*, des **différences significatives** sont observées entre les DPL de Mayotte ($63,4 \pm 5,8$ jours ; [38-78 jours]) et celles de la Réunion ($114,5 \pm 21,1$ jours ; [82,5-133,5 jours]).

Malgré que nous soyons en présence de 2 espèces différentes, les résultats de l'article sur les DPL restent inchangés au sein des océans Indien et Pacifique. Bien que les moyennes

¹ Le spécimen 11823 présente une DPL = 92 jours et le spécimen 11825, une DPL = 141 jours.

des DPL de chaque espèce soient similaires, la variation des DPL au sein de chaque océan n'est pas la même ; dans le Pacifique, entre le Vanuatu et la Polynésie Française, les DPL varient dans de mêmes gammes de valeurs (d'une cinquantaine de jours à 130 jours), ce qui n'est pas le cas entre Mayotte [38-78 jours] et La Réunion [82,5-133,5 jours] dans l'océan Indien.

Ces différences ne sont pas encore expliquées mais elles pourraient être liées à la saisonnalité des températures et des courants qui n'impacte pas de la même façon les îles du Nord-Ouest et celles du Sud-Ouest de l'océan Indien. C'est notamment ce qu'ont montré Teichert et al. (2014) chez *Sicyopterus lagocephalus*, une espèce à large répartition comme *E. fusca* ; ce Sicydiinae présente des résultats similaires à ceux observés chez *E. klunzingerii* ; Teichert et al. (2014) montrant que les DPL et la taille des spécimens sont liés à la date d'éclosion et donc sont sous l'influence des saisons rythmant les températures des eaux de surface.

Synthèse et perspectives

Dans cette synthèse, nous discuterons, dans un premier temps, de l'utilité d'une révision taxonomique au sein du genre *Eleotris* dans l'Indo-Pacifique. Dans un second temps, nous commenterons les résultats phylogénétiques et la clé de détermination mise en place à partir de la révision taxonomique. Après avoir fait un état actualisé des connaissances sur le genre *Eleotris* de cette région (amphidromie, dispersion, etc.), nous discuterons de l'impact des événements biogéographiques et de la courantologie, à travers le modèle *E. fusca*. Enfin, nous replacerons ces travaux dans un contexte de gestion et de conservation.

I. Les espèces du genre *Eleotris*, des espèces clés dans les systèmes insulaires

Les *Eleotris*, espèces euryhalines que l'on retrouve essentiellement dans les eaux saumâtres, les estuaires et dans les cours inférieurs des rivières, font parties de l'une des deux familles de Téléostéens, les Eleotridae, qui dominent les systèmes insulaires dulçaquicoles avec les Gobiidae. De par leur régime alimentaire (*i.e.*, carnivores), les *Eleotris* sont des espèces clés qui permettent, à leur échelle, de réguler la chaîne alimentaire de ces milieux.

Leur biologie a été un peu étudiée (*i.e.*, reproduction, régime alimentaire, comportement de prédation) mais aucune étude de taxonomie, de génétique des populations ou de dispersion n'avait été réalisée sur l'ensemble de leur aire de répartition. Pourtant, dans leur environnement, les *Eleotris* présentent tous un pattern de couleur similaire, quelle que soit l'espèce, rendant ainsi leur identification compliquée et les résultats obtenus dans les études de biologie incertaines dans leur utilisation, puisque les espèces sont souvent mal déterminées.

II. Une révision taxonomique du genre *Eleotris* était primordiale avant toute étude visant à analyser les traits d'histoire de vie d'un *Eleotris* en particulier

Nous avons vu dans le chapitre introductif que les descriptions des *Eleotris* de l'Indo-Pacifique, toutes anciennes, étaient souvent courtes et présentaient peu d'éléments diagnostics permettant de caractériser les espèces et d'être sûr de leur validité. La taxonomie de ce groupe n'avait jamais été approfondie et restait donc confuse, difficile, et aucune étude n'avait été réalisée pour la résoudre. Dans le cadre de tout travail visant à examiner les communautés de

poissons des systèmes insulaires et en particulier du compartiment des espèces diadromes, il était donc essentiel de clarifier cette taxonomie afin de relier avec certitude les traits d'histoire de vie que nous souhaitions observer aux « bonnes » espèces ; car il est primordial avant toute étude de biologie ou d'écologie, en particulier avec des objectifs de gestion et de conservation, de savoir de quelle espèce nous parlons.

Dans ce contexte, nous avons consulté les spécimens types présents dans les collections muséales en combinant des méthodes classiques basées sur la morpho-méristique ou le Barcoding et des méthodes innovantes de NGS (séquençage du mitogénome complet), selon le concept de taxonomie intégrative. Nous avons par la suite combiné les résultats obtenus avec ceux obtenus sur les spécimens que nous avons collectés lors de nos missions dans l'Indo-Pacifique. Une liste des espèces valides ainsi qu'une clé d'identification des *Eleotris* adultes de cette région ont pu être mises en place. Nos travaux ont ainsi permis de régler la confusion qui régnait dans ce genre. Une clé sur les 3 espèces les plus répandues a aussi été réalisée pour les post-larves. Ceci sera particulièrement utile aux gestionnaires de l'environnement et des pêches.

A partir de cette révision taxonomique, nous avons pu mettre en évidence que le critère le plus discriminant chez les *Eleotris* est celui de la présence de papilles sensorielles céphaliques sur l'opercule et sous les yeux qui permettent de distinguer (dans presque tous les cas) les espèces ou des groupes d'espèce entre elles. L'association de ce dernier aux critères morpho-méristiques permet d'obtenir plus facilement la détermination d'une espèce. A la suite de nos travaux morpho-méristiques, nous distinguons 14 espèces valides au sein de l'Indo-Pacifique (*cf.* Chapitre 2, Tableau 20). Parmi ces espèces figurent une nouvelle espèce que nous avons découvert aux îles Salomon lors de notre mission en 2015, *E. bosetoi* (Chapitre 3), et 3 espèces que nous identifions comme cryptiques, *E. cf. melanosoma* sp2 (océan Indien), sp3 (Indonésie) et *E. cf. pellegrini* (Madagascar, Seychelles).

III. Génomique, taxonomie et évolution

Nous avons réalisé deux phylogénies à partir de tous les individus dont il a été possible de séquencer l'ADN. Une première phylogénie a été construite à partir d'un fragment du gène mitochondrial *COI* (585 pb) et une seconde à partir du génome mitochondrial partiel (7143 pb) (Chapitre 4).

A partir de ces deux phylogénies, nous avons mis en évidence, en plus par rapport à la morpho-méristique, la présence de 2 autres espèces cryptiques initialement placées sous les noms d'espèces *E. fusca* et *E. melanosoma* : *E. cf. fusca* (océan Indien) et *E. cf. melanosoma* sp1 (océan Pacifique), conduisant à une nouvelle liste de 16 espèces valides d'*Eleotris* (cf. Chapitre 4, Tableau 4). La taxonomie basée sur la morpho-méristique nous laissait penser à la présence possible de trois entités sous le nom d'*E. melanosoma* (Chapitre 2) et la génétique nous en a dévoilé 4, soulignant l'intérêt d'associer plusieurs méthodes en taxonomie.

La superposition des données taxonomiques aux données de phylogénie moléculaire, nous a permis de souligner que la phylogénie reflète les patterns de papilles sensorielles céphaliques situés sur les opercules. Il semblerait que l'ancêtre supposé des *Eleotris* avait un pattern « ouvert » sur ces opercules ; cependant cela reste à confirmer en raison de la place instable d'*E. oxycephala* dans les phylogénies, néanmoins toujours situé à la base de celle-ci. Nos phylogénies nous ont donc permis d'appréhender l'évolution du groupe.

Une nouvelle phylogénie réalisée avec un plus grand nombre de spécimens appartenant à *E. oxycephala*, *E. cf. melanosoma* sp1, 2, 3 et *E. cf. pellegrini*, et en associant en plus un gène nucléaire, nous permettrait de renforcer les résultats obtenus. Une collaboration future est prévue avec Ken Maeda (université de Ryūkyū) afin de résoudre au mieux la phylogénie des *Eleotris* en travaillant à la description des espèces cryptiques d'*E. cf. melanosoma* et à la position d'*E. oxycephala* au sein du genre.

A travers l'analyse phylogénétique du genre *Eleotris*, nous avons pu voir que la taxonomie intégrative est essentielle pour la révision des genres et la description d'espèces complexes que des méthodes classiques peine à distinguer.

IV. L'étude approfondie du complexe « *fusca* » permet de mettre en évidence la présence de barrières à la dispersion au sein de l'Indo-Pacifique et apporte de nouvelles perspectives quant à la dispersion larvaire en mer

Parmi les espèces étudiées, nous avons mis en évidence que certaines d'entre elles étaient plus largement distribuées dans l'Indo-Pacifique, en particulier *E. fusca* et *E. acanthopoma*. Il était donc intéressant d'étudier leur phylogéographie.

Tout comme nous l'avions observé avec les phylogénies, l'étude de la phylogéographie d'*E. fusca* souligne la présence de deux espèces confondues sous ce nom (Chapitre 5). La première est une espèce cryptique et endémique de l'océan Indien, que nous avons appelée dans un 1^{er} temps *E. cf. fusca* et dont le nom exact est *E. klunzingerii* Pfeffer, 1893 que nous avons revalidé (auparavant placé dans les synonymes d'*E. fusca* par Eschmeyer & Fricke (2016) et Kottelat (2016)) (Chapitre 6), et la seconde est *E. fusca* qui reste une espèce à large répartition mais néanmoins moins abondante dans l'océan Indien.

La présence d'*E. klunzingerii* n'avait pu être constatée lors du bilan taxonomique (Chapitre 2) car sa distinction morphologique avec *E. fusca* est loin d'être facile, étant donné que tous les caractères morpho-méristiques se chevauchent ; seul le nombre d'écaillés sur la série transverse antérieure (TRF) semble plus important pour les males d'*E. klunzingerii* (18-30 vs. 13-22). Dans ce cas précis, ce sont les analyses moléculaires qui ont permis de valider la présence de cette espèce ; celle-ci présentant en moyenne 5,6% de divergence sur le gène *COI* (soit 32 sites diagnostiques) avec son espèce sœur *E. fusca*.

Une analyse microchimique des otolithes réalisée *via* un laser à femtoseconde de pointe, le fs-LA-ICP-MS, nous a permis de valider le cycle amphidrome chacune de ces espèces (Chapitre 7), ne laissant ainsi aucun doute sur la réalité d'une phase larvaire marine.

L'étude microstructurale des otolithes a montré que la durée de la phase larvaire marine (DPL) est homogène chez *E. fusca* entre les îles de l'océan Pacifique et hétérogène chez *E. klunzingerii* entre les îles de l'océan Indien. Ceci nous a amené à nous intéresser à la phylogéographie de ces deux espèces afin de voir s'il existait un lien entre leur dispersion larvaire en mer et leur répartition biogéographique.

En plus de renforcer les résultats démontrant que *E. klunzingerii* et *E. fusca* sont bien deux espèces sœurs, l'étude de la phylogéographie du complexe « *fusca* » met en évidence que la répartition de l'espèce *E. fusca* n'est pas homogène. En effet, bien que cette dernière

soit à large répartition dans l'Indo-Pacifique, elle présente, *a priori*, peu d'individus dans l'océan Indien et plusieurs populations dans l'océan Pacifique (une en Polynésie *i.e.*, les îles Cook et la Polynésie Française, exceptées les îles Marquises qui constituent une population à elles seules ; et une constituée de toutes les autres îles du Pacifique) ; pourtant nous avons observé une homogénéité de la DPL nous laissant croire à une libre dispersion des larves au sein de l'océan Pacifique. Cet isolement des îles polynésiennes par rapport aux autres îles du Pacifique a déjà été observé chez d'autres espèces amphidromes et est souvent expliqué par la présence de barrières à la dispersion telles que les courants et les contre-courants de surface (*i.e.*, le CSE¹ et le MCC²) qui contraindraient les larves à des secteurs de dispersion. Dans le cas des spécimens d'*E. fusca*, seule la dispersion des larves des îles du Nord-Ouest et du Sud-Ouest de l'océan Pacifique vers les îles polynésiennes est possible et non l'inverse. Cependant, les courants (actuels et passés) ne sont pas les seuls facteurs agissant sur la connectivité des espèces marines (Benzie 1998, Lessios 1998, Planes & Fauvelot 2002). En plus de la courantologie, la topologie des fonds marins peut aussi avoir un impact sur la dispersion des espèces et donc sur leur structuration génétique. La présence de fosses océaniques pourrait très bien avoir un effet sur la migration des larves. Nous avons vu, en introduction, qu'au sein de la Polynésie (*i.e.*, Rarotonga, Polynésie Française, Niue, îles Pitcairn, Tokelau, Tuvalu, Tonga, Samoa, Wallis et Futuna) deux types de faune se distinguent, l'une de type mélanésien dont les limites d'extension vers l'Est ne dépassent pas Futuna et/ou Samoa, et l'autre de type polynésien dont les limites d'extension vers l'Ouest ne dépassent pas ces mêmes îles (Keith et al. 2013). Cette limite semble être due à la présence des fosses de Tonga et Kermadec. Avec notre étude phylogéographique d'*E. fusca*, nous pouvons constater que cette séparation entre les îles mélanésiennes et polynésiennes existe aussi au niveau populationnel. Une combinaison de courants non favorables associés à des fosses océaniques pourrait donc constituer une barrière efficace à la dispersion des espèces et donc influencerait leur répartition.

Le nombre très faible de spécimens d'*E. fusca* présent sur les îles de l'océan Indien dans nos échantillons (3,7%) semble aussi indiquer l'influence d'une grande barrière à la dispersion très filtrante, la barrière Indo-Pacifique (*i.e.*, Indo-Pacific Barrier, IPB) entre l'océan Indien et l'océan Pacifique. Celle-ci est connue pour avoir été créée, à plusieurs

¹ CSE : Courant Sud Equatorial

² MCC : Marquesas Counter-Current / Contre-courant des îles Marquises

reprises, durant les baisses du niveau marin lors du Pléistocène (Briggs 1974, Voris 2000) créant ainsi une barrière terrestre infranchissable et donc, un frein à la dispersion des larves de l'océan Pacifique vers l'océan Indien.

Il est intéressant de noter que, lorsque l'on compare la phylogéographie de deux espèces d'*Eleotris* présentant la même aire de répartition (*i.e.*, *E. fusca* et *E. acanthopoma*), les flux de gènes de ces dernières sont différents. En effet, une répartition homogène du flux génétique a été observée chez *E. acanthopoma*, avec aucune structuration de population, alors que ce n'est pas le cas d'*E. fusca* qui présente plusieurs populations dans l'océan Pacifique et peu d'individu dans l'océan Indien. Elles ne semblent donc pas partager le même mode de dispersion larvaire et/ou la même histoire biogéographique.

L'histoire évolutive de ces deux taxons peut aussi être différente, il serait donc intéressant de pouvoir reconstruire l'histoire généalogique de certains de leurs gènes (*i.e.*, un gène mitochondrial, voire le mitogénome complet, et un gène nucléaire) afin de dater les événements clés qui auraient induit à l'histoire démographique de chaque espèce.

La comparaison de nos résultats concernant la DPL et la répartition biogéographique d'*E. fusca* et d'*E. klunzingerii* met aussi en évidence qu'il n'existe pas de lien direct entre le temps passé en mer et le mode de dispersion des larves chez ces espèces.

La compréhension du mode de dispersion larvaire chez les espèces amphidromes est donc loin d'être aisée. A partir de nos résultats concernant la dispersion d'*E. klunzingerii* (DPL Mayotte : $63,4 \pm 5,8$ jours ; [38-78 jours] et DPL Réunion ($114,5 \pm 21,1$ jours ; [82,5-133,5 jours]) (chapitre 7), nous avons émis l'hypothèse, comme l'ont fait Teichert et al. (2014), que la durée de la phase larvaire pourrait être liée à la saisonnalité des températures et des courants.

Nous avons vu que les fonds marins présentent des topologies hétérogènes *i.e.*, des fosses, des monts sous-marins etc. Pourquoi la courantologie et/ou la topologie aurait une influence sur la dispersion des larves d'*E. fusca* (flux de gènes hétérogène, plusieurs populations) et aucune sur celle d'*E. acanthopoma* (flux de gène homogène et absence de populations) ? Le comportement larvaire est-il différent ? Comment savoir à quelle profondeur se déplacent les larves ? Toutes ces informations sont importantes pour la compréhension du comportement larvaire en mer car il semble évident que toutes les espèces n'empruntent pas les mêmes chemins dans la colonne d'eau et donc ne se déplacent pas à la

même profondeur. Sachant que les otolithes renferment de nombreuses informations telles que les conditions de migration (composition élémentaire des différents habitats traversés) des individus depuis leur éclosion, il semblerait intéressant de pouvoir mesurer les variations des isotopes de l'oxygène ($\delta^{18}\text{O}/\delta^{16}\text{O}$) dans ceux-ci. En effet, ces isotopes nous permettraient d'obtenir des données sur la température des eaux dans lesquelles les larves se sont déplacées au cours de leur vie marine et donc de pouvoir estimer à quelle profondeur elles se sont déplacées dans les océans.

Dans un futur proche, nous espérons donc, avec un protocole adapté, obtenir ces informations, notamment par l'utilisation d'une sonde ionique NanoSims 50 (SIMS : Secondary Ions Mass Spectrometry). Et nous pourrions ainsi comparer les résultats entre les otolithes de spécimens appartenant à *E. acanthopoma* et à *E. fusca*.

Au cours de notre étude, nous avons en effet eu l'opportunité de commencer à mettre en place ce protocole afin de calibrer la sonde ionique et ainsi de pouvoir explorer la diversité des profils microchimiques. Dans un premier temps, nous cherchions à analyser les ratios isotopiques du strontium (Sr) et d'éléments traces métalliques afin de détecter les origines maternelles des jeunes poissons en ciblant l'analyse sur les nucléus des otolithes. Dans un second temps, nous avons essayé d'obtenir le rapport isotopique de l'oxygène afin de caractériser les eaux dans lesquelles les post-larves se seront déplacées. Ces travaux, très chronophages et couteux, n'ont pas pu aboutir complètement dans le cadre de cette thèse, déjà volumineuse en terme de thématiques. Néanmoins, nous avons pu montrer à partir de l'analyse d'un nucléus d'*E. fusca*, que nous avons un signal maternel dans le nucléus avec une forte concentration en silicium (Fig. 1). Tout ceci semble donc prometteur pour des analyses futures et mon travail sert déjà de base à des analyses plus poussées de la calibration de la sonde ionique dans le cadre d'étude sur les anguilles.

Image a : $^{4}\text{Mg}/^{44}\text{Ca}$

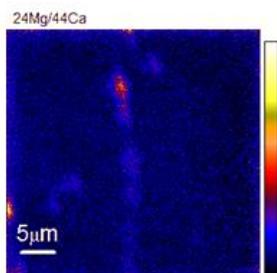


Image b : $^{88}\text{Sr}/^{44}\text{Ca}$

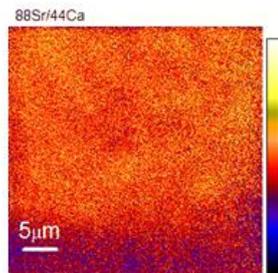


Image c : $^{55}\text{Mn}/^{44}\text{Ca}$

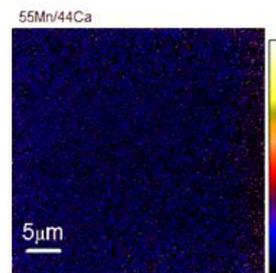


Image d : $^{138}\text{Ba}/^{44}\text{Ca}$

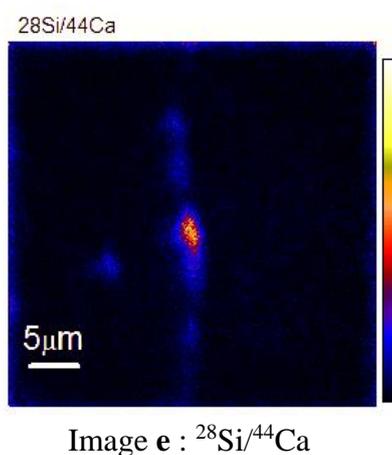
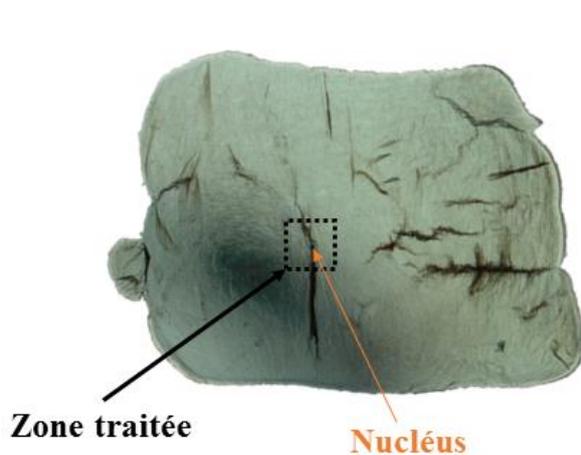
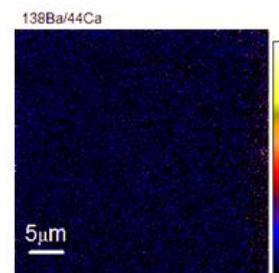


Figure 1 : Résultats préliminaires pour l'analyse de ratios isotopiques (a - e) sur un otolithe d'*E. fusca*. Plus la couleur tant vers le jaune, voire le blanc, plus le rapport isotopique est élevé dans la zone concernée. On note la présence d'un rapport élevé en ^{88}Sr (image b) ce qui est normal car nous analysons la zone correspondant à la vie larvaire en mer. Mais le plus intéressant est le signal fort de ^{28}Si (silicium) au centre du nucléus sur l'image e.

V. Une nouvelle liste d'espèces d'*Eleotris* dans la zone Indo-Pacifique pour de nouveaux plans de gestion et de conservation

Au sein des milieux insulaires, les activités anthropiques (pêche, urbanisation, pollution) et les événements météorologiques exercent de nombreuses pressions sur les habitats dulçaquicoles (*cf.* Introduction). Bien que la phase larvaire en mer permette d'augmenter la résilience des espèces amphidromes (*i.e.*, la capacité des populations à absorber les perturbations du milieu), il n'en est pas moins important de surveiller leur stock et, de ce fait, leur évolution au sein des cours d'eau des îles qu'elles colonisent. L'amphidromie serait un moyen d'éviter l'extinction lorsqu'un cours d'eau, voire une île, se retrouve perturbé(e) et instable, en colonisant les autres rivières, voire les îles alentours, pour ensuite pouvoir recoloniser le(s) système(s) revenu(s) à un état stable (Keith 2003).

Néanmoins, lorsque les problèmes sont d'ordre anthropique, ils peuvent se révéler insurmontables et il convient de mettre en place des plans de gestion et de conservation adaptés à chaque espèce et habitat. C'est à partir de la nouvelle liste des espèces valides d'*Eleotris* que ces plans devront être ajustés pour les îles de l'Indo-Pacifique. En effet, parmi les 16 espèces que nous avons validées :

- 5 espèces sont endémiques (*E. bosetoi* – îles des Salomon ; *E. aquadulcis* – Papouasie Nouvelle Guinée ; *E. sandwicensis* – îles d'Hawaï ; *E. vomerodentata*, *E. pellegrini* – Madagascar),
- 9 espèces sont présentes dans des régions définies (*E. eigenmanni* – Indonésie ; *E. oxycephala*, *E. balia*, *E. cf. melanosoma* sp3 – Asie ; *E. melanosoma*, *E. cf. melanosoma* sp1 – océan Pacifique ; *E. cf. pellegrini* – Madagascar et Seychelles, *E. klunzingerii*, *E. cf. melanosoma* sp2 – océan Indien),
- et seulement 2 espèces sont à large répartition dans l'Indo-Pacifique (*E. fusca* et *E. acanthopoma*).

Deux d'entre elles figurent dans la liste rouge mondiale des espèces menacées (IUCN), *E. aquadulcis* et *E. pellegrini* avec le statut de « quasi menacée » ; et deux autres sont présentes dans la liste rouge des espèces menacées de France (IUCN) sur l'île de La Réunion, *E. fusca* et *E. acanthopoma* (cité sous le synonyme *E. mauritiana*) dans respectivement les

catégories d'espèces « en danger » et « en danger critique ». Les mesures de gestion et de conservation ne seront donc pas les mêmes en fonction des espèces.

D'autre part, au vu des résultats de phylogéographie, il est évident que les modes de gestion doivent être différents selon les régions, selon la part d'auto-recrutement et d'allo-recrutement des espèces. En effet, les populations d'espèces amphidromes endémiques sont régies par un équilibre subtil entre les rivières dites « sources » (pouvant devenir des rivières puits sous l'action anthropique) et des rivières dites « puits » (qui, une fois réhabilitées, peuvent devenir des rivières sources). Néanmoins, le stock des espèces endémiques étant limité, la destruction simultanée d'habitats vitaux ou des quelques rivières où leurs populations existent, pourrait suffire à faire disparaître ces espèces (Keith & Marion 2002, Souchon & Keith 2002).

Il conviendrait aussi de mettre à jour les fiches d'identification de chaque espèce dans les bases de données telles que FishBase et Catalog of Fishes afin de faciliter le travail des gestionnaires et des scientifiques s'intéressant au genre *Eleotris* dans l'Indo-Pacifique.

Cette thèse a permis de faire une mise à jour complète du statut des *Eleotris* présents dans l'Indo-Pacifique et d'avoir une vision réelle du nombre d'espèces présentes, de leur évolution, leur distribution et des liens qui les relient au sein de l'Indo-Pacifique. Nos travaux montrent que les patrons d'évolution des espèces, ayant conduit à leur apparition, dispersion et distribution, sont complexes et dépendants de nombreux facteurs. Nous espérons mettre fin à plus d'un siècle de confusion au sein du genre *Eleotris* dans cette région et donner de nouveaux outils aux gestionnaires de l'environnement et des pêcheries.

Bibliographie

-A-

- Abdou A.** – 2016 – Amphidromie et phylogéographie des Neritidae amphidromes de l'Indo-Pacifique. PhD dissertation, EPHE, Perpignan.
- Agorreta A. & Rüber L.** – 2012 – A standardized reanalysis of molecular phylogenetic hypotheses of Gobioidi? Systematics and Biodiversity, 10: 375-390.
- Ahti P.A., Coleman R.R., DiBattista J.D., Berumen M.L., Rocha L.A., Bowen B.W.** – 2016 – Phylogeography of Indo-Pacific reef fishes: sister wrasses *Coris gaimard* and *C. cuvieri* in the Red Sea, Indian Ocean and Pacific Ocean. Journal of Biogeography. doi:10.1111/jbi.12712.
- Akaike H.** – 1974 – A new look at the statistical model identification. IEEE Transactions on Automatic Control, 19: 716-723.
- Akihito.** – 1967 – On four species of the gobiid fishes of the genus *Eleotris* found in Japan. Japanese Journal of Ichthyology, 14: 135-166.
- Akihito, Iwata A., Kobayashi T., et al.** – 2000 – Evolutionary aspects of gobioid fishes based upon a phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b genes. Gene, 259: 5–15.
- Arai T., Hirata T., Takagi Y.** – 2007 – Application of laser ablation ICPMS to trace the environmental history of chum salmon *Oncorhynchus keta*. Marine Environmental Research, 63: 55-66.
- Avise J.C.** – 2000 – Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA: 1-447.
- Avise J.C.** – 2009 – Phylogeography: retrospect and propect. Journal of Biogeography, 36: 3-15.

-B-

- Bagliniere J.L., Castanet J., Conand F., Meunier F.J.** – 1992 – Tissus durs et âge individuel des Vertébrés. Co-édition ORSTOM-INRA, Paris, 457p.
- Balon E.K. & Bruton MN.** – 1994 – Fishes of the Tatinga River, Comoros with comments on freshwater amphidromy in the goby *Sicyopterus lagocephalus*. Ichthyological Exploration Freshwater, 5: 25-40.
- Bandelt H.J., Forster P., Rohl A.** – 1999 – Median-Joining network for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology Evolution, 16: 37-48.

- Barber P.H. & Bellwood D.R.** – 2005 – Biodiversity hotspots: evolutionary origins of biodiversity in wrasses (Halichoeres: Labridae) in the Indo-Pacific and new world tropics. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 35: 235-253.
- Barber P.H., Erdmann M.V., Plambi S.R.** – 2006 – Comparative phylogeography of three codistributed stomatopods: origins and timing of regional lineage diversification in the coral Triangle. *Evolution*, 60: 1825-1839.
- Barber P.H., Plambi S.R., Erdmann M.V., Moosa M.K.** – 2000 – A marine Wallace's line? *Nature*, 406: 692-693.
- Barber P.H., Plambi S.R., Erdmann M.V., Moosa M.K.** – 2002 – Sharp genetic breaks among populations of *Haptosquilla pulchella* (stomatopoda) indicates limits to larval transport: patterns, causes and consequences. *Molecular Ecology*, 11: 659-674.
- Bell KNI.** – 1999 – An overview of goby-fry fisheries. *Naga, the ICLARM Quarterly*, 22(4), pp. 30-36.
- Bell KNI., Brown JA., Pepin P.** – 1995 – Seasonal, inverse cycling of length and age at recruitment in the diadromous gobies *Sicydium punctatum* and *Sicydium antillarum* in Dominica, West Indies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 52:1535-1545.
- Bellwood D.R. & Wainwright P.W.** – 2002 – The history and biogeography of fishes on corals reefs. *Coral reef fishes: dynamics and diversity in a complex ecosystem* (ed. By P.F. Sale), pp. 5-32. Academic Press, London.
- Benzie J.A.H.** – 1999 – Genetic structure of coral reef organisms: ghosts of dispersal past. *American Zoologist*, 39: 131-145.
- Benzie J.A.H., Ballment E., Forbes A.T. et al.** – 2002 – Mitochondrial DNA variation in Indo-Pacific populations of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Molecular Ecology*, 11: 2553-2569.
- Borkin I.V.** – 1991 – Ichthyoplankton of western Spitzbergen coastal waters. *Journal of Ichthyology*, 31: 680-685.
- Boseto D. & Sirikolo M.** – 2010 – A Report on The Fresh Water Fishes and other fauna. Biodiversity of two Proposed Protected Areas on Southwest Choiseul Island, Solomon Islands. WWF, Honiara, Solomon.
- Boseto D., Morrison C, Pikacha P., T. Pitakia T.** – 2007 – Biodiversity and conservation of freshwater fishes in selected rivers on Choiseul Island, Solomon Islands. *South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 3: 16- 21.

Boseto D., M. Sirikolo, Boseto H. – 2010 – Freshwater fishes of the Upper Vila River recorded for World Wildlife for Nature Baseline Survey of Crater of Kolombangara Island (19 July – 23 July 2010). WWF, Honiara, Solomon.

Bowen B.W., Bass A.L., Muss A., Carlin J., Roberston D.R. – 2006 – Phylogeography of two Atlantic squirrelfishes (Family Holocentridae): exploring links between pelagic larval duration and population connectivity. *Molecular Ecology*, 149: 899-913.

Bowler D.E. & Benton T.G. – 2005 – Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics. *Biological Reviews*, 80: 205-225.

Briggs J.C. – 1974 – *Marine Zoogeography*. New York: McGraw-Hill.

Brothers EB., Mathews CP., Lasker R. – 1976 – Daily growth increments in otoliths from larval and adult fishes. *Fishery Bulletin*, 74: 1-8.

-C-

Campana S.E. – 1999 – Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series*, 188: 263-297.

Campana S.E., Chouinard G.A., Hanson J.M., Fréchet A., Bratney J. – 2000 – Otolith elemental fingerprints as biological tracers of fish stocks. *Fisheries Research*, 46: 343-357.

Campana S.E. & Thorrold S.R. – 2001 – Otoliths, increments, and elements: key to a comprehensive understanding of fish populations? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58: 30-38.

Carpenter K.E., Barber P.H., Crandall E.D., et al. – 2011 – Comparative phylogeography of the Coral Triangle and implications for marine management. *Journal of Marine Biology*, ID 396982, 14 p. doi:10.1155/2011/396982.

Castelin M., Feutry P., Hautecoeur M., Marquet G., Wowor D., Zimmermann G., Keith P. – 2013 – New insight on population genetic connectivity of widespread amphidromous prawn *Macrobrachium lar* (Fabricius, 1789) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Marine Biology*, 160: 1395-1406.

Chang MY., Wang CH., You CF., Tzeng WN. – 2006 – Individual-based dispersal patterns of larval gobies in an estuary as indicated by otolith elemental fingerprints. *Scientia Marina*. 70: 165-174.

Chen W.J., Bonillo C., Lecointre G. – 2003 – Repeatability of clades as a criterion of reliability: a case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with larger number of taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 26: 262-288.

- Clobert J., Le Galliard J.F., Cote J., Meylan S., Massot M.** – 2009 – Informed dispersal, heterogeneity in animal dispersal syndromes and dynamics of spatially structured populations. *Ecology Letters*, 12: 197-209.
- Closs G.P., Smith M., Barry B., Markwitz A.** – 2003 – Non diadromous recruitment in coastal population of common bully (*Gobiomorphus cotidianus*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 37: 301-313.
- Coleman R.R., Eble J.A., Dibatiista J.D., Rocha L.A., Randall J.E.** – 2016 – Regal phylogeography: Range-wide survey of the marine angelfish *Pyroplites diacanthus* reveals evolutionary partitions between the Red Sea, Indian Ocean, and the Pacific Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 100: 243-253.
- Connolly S., Bellwood D.R., Hughes T.P.** – 2003 – Indo-Pacific biodiversity of coral reefs: deviations from a mid-domain model. *Ecology*, 84: 2178-2190.
- Corbarieu A.** – 2008 – Caractérisation de la vie larvaire et des premiers stades de développement en eau douce chez *Awaous commersoni*, *Eleotris fusca* et *Eleotris mauritiana*, poissons amphidromes de La Réunion. Master degree dissertation, Polytechnique Montpellier, France.
- Covich A.P.** – 2006 – Dispersal - Limited biodiversity of tropical insular streams. *Polish Journal of Ecology*, 54: 523-547.
- Cowen R.K., Gawarkiewicz G., Pineda J., Thorrold S.R., Werner F.E.** – 2007 – Population connectivity in marine systems: an overview. *Oceanography*, 20: 14-21.
- Cowman P.F. & Bellwood D.R.** – 2011 – Coral reefs as drivers of cladogenesis: expanding coral reefs, cryptic extinction events, and the development of biodiversity hotspots. *Journal of Evolutionary Biology*, 24: 2543-2562.
- Cowman P.F. & Bellwood D.R.** – 2013 – The historical biogeography of coral reef fishes: global patterns of origination and dispersal. *Journal of Biogeography*, 40: 209-224.
- Crook D.A., Macdonald J.I., O'Connor J.P. & Barry B.** – 2006 – Use of otolith chemistry to examine patterns of diadromy in the threatened Australian grayling *Prototroctes maraena*. *Journal of Fish Biology*, 69: 1330-1344.
- Crandall E.D., Frey M.A., Grosberg R.K., Barber P.H.** – 2008 – Contrasting demographic history and phylogeographical patterns in two Indo-Pacific gastropods. *Molecular Ecology*, 17: 611–626.
- Crandall E.D., Taffel J.R., Barber P.H.** – 2010 – High gene flow due to pelagic larval dispersal among South Pacific archipelagos in two amphidromous gastropods (Neritomorpha: Neritidae). *Heredity*, 104: 563-572.

Cushing DH. – 1990 – Plankton production and year-class strength in fish populations: an update of the match/mismatch hypothesis. *Advances in Marine Biology*, 26: 249-293.

-D-

Dahrudin H., Hutama A., Busson F., Sauri S., Hanner R., Keith P., Hadiaty R., Hubert N. – 2016 – Revisiting the ichthyodiversity of Java and Bali through DNA barcodes: taxonomic coverage, identification accuracy, cryptic diversity and identification of exotic species. *Molecular Ecology Research*, doi: 10.1111/1755-0998.12528.

Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. – 2012 – jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772.

Darwin Charles – 1859 – L'origine des espèces. Edition corrigée et mise à jour en 2008, texte établi par D. Becquemont à partir de la traduction de l'anglais d'E. Barbier, GF Flammarion.

Daverat F., Tomas J., Lahaye M., Plamer M., Elie P. – 2005 – Tracking continental habitat shifts of eels using otolith Sr/Ca ratios: validation and application to the coastal, estuarine and riverine eels of the Gironde-Garonne-Dordogne watershed. *Marine and Freshwater Research*, 56: 619-627.

Dayrat B. – 2005 – Toward integrative taxonomy. *Biological Journal of Linnean Society*, 85: 407-415.

DeBoer T.S., Subia M.D. Ambariyanto, Erdmann M.V., Kovitvongsa K., Barber P.H. – 2008 – Phylogeography and limited genetic connectivity in the endangered boring giant clam across the coral triangle. *Conservation Biology*, 22: 1255-1266.

De Bruyn M. & Mather P.B. – 2007 – Molecular signatures of Pleistocene sea-level changes that affected connectivity among freshwater shrimp in Indo-Australian waters. *Molecular Ecology*, 16: 4295-4307.

De Bruyn M., Wilson J.A., Mather P.B. – 2004 – Huxley's line demarcates extensive genetic divergences between eastern and western forms of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 251-257.

Delacroix P. & Champeau A. – 1992 – Pontes en eau douce de *Sicyopterus lagocephalus* (Pallas) poisson Gobiidae amphibionte des rivières de la Réunion. *Hydroécologie appliquée*, 4: 49-63.

Delsuc F. & Douzery E.J.P. – 2004 – Les méthodes probabilistes en phylogénie moléculaire : L'approche bayésienne. In: *Avenir et pertinence des méthodes d'analyses en phylogénie moléculaire*. Biosystema 22, Société française de systématique (Paris).

- Dennenmoser S., Thiel M., Schuabrt CD.** – 2010 – High genetic variability with no apparent geographic structuring in the mtDNA of the amphidromous river shrimp *Cryphiops caementarius* (Decapoda: Palaemonidae) in northern-central Chile. *Journal of Crustacean Biology*, 30: 762-766.
- De Pontual, H. & Geffen, A.J.** – 2002 – Otolith microchemistry. *Manual of fish sclerochronology*, pp. 243-303.;
- Dettai A., Lautredou A.C., Bonillo C., Goimbault E., Busson F., R. Causse R., Couloux A, Cruaud C., Duhamel G., Denys G.** – 2011 – The Actinopterygian diversity of the ceamarc cruises: barcoding and molecular taxonomy as a multi-level tool for new findings. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 58: 250-263.
- Dibattista J.D., Wilcox C., Craig M.T., Rocha L.A., Bowen B.W.** – 2011 – Phylogeography of the Pacific Blueline Surgeonfish, *Acanthurus nigroris*, reveals high genetic connectivity and a cryptic endemic species in the Hawaiian Archipelagos. *Journal of Marine Biology*. Article ID 839134, pp. 1–17. doi:10.1155/2011/839134.
- Doherty P., Planes S., Mather P.** – 1995 – Gene flow and larval duration in seven species of fish from the great barrier reef. *Ecology*, 76: 2373-2391.

-E-

- Ekman S.** – 1953 – Zoogeography of the sea. Sidgwick and Jackson, London. 417p.
- Eldson T.S. & Gillanders B.M.** – 2006 – Temporal variability in strontium, calcium, barium, and manganese in estuaries: implications for reconstructing environmental histories of fish from chemicals in calcified structures. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 66: 147-156.
- Eschmeyer W.N. & Fricke R.** – 2016 – Catalog of fishes: Genera, Species, References. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>).
Electronic version
- Excoffier L., Laval G., Schneider S.** – 2005 – Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Excoffier L. & Smouse P.E.** – 1994 – Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. *Genetics*, 136: 343-359.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M.** – 1992 – Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.

-F-

- Feutry P., Keith P., Pécheyran C., Claverie F., Robinet T.** – 2011 – Evidence of diadromy in the French Polynesian *Kuhlia malo* (Teleostei: Percoidae) inferred from otolith microchemistry analysis. *Ecology of Freshwater Fish*, 20: 636-645.
- Feutry P., Tabouret H., Maeda K., Pécheyran C., Keith P.** – 2012 – Diadromous life cycle and behavioral plasticity in freshwater and estuarine Kuhliidae species (Teleostei) revealed by otolith microchemistry. *Aquatic Biology*, 15: 195-204.
- Feutry P., Vergnes A., Broderick D., Lambourdiere J., Keith P.** – 2013 – Stretched to the limit; can a short pelagic larval duration connect adult populations of an Indo-Pacific diadromous fish (*Kuhlia rupestris*)? *Molecular Ecology*. 22: 1518-1530.
- Froese R., Pauly D., Editors.** – 2016 – Fishbase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (01/2016).
- Fu Y.X.** – 1997 – Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915–925.

-G-

- Gaither M., Bowen B., Bordenave T., Rocha L., Newman S.J, Gomez J., Herwerden L., Craig M.** – 2011a – Phylogeography of the reef fish *Cephalopholis argus* (Epinephelidae) indicates Pleistocene isolation across the indo-pacific barrier with contemporary overlap in the coral triangle. *BMC Evolutionary Biology*. 11: 189, doi:10.1186/1471-2148-11-189.
- Gaither M.R., Jones S.A., Kelley C., Newman S.J., Sorenson L.** – 2011b – High Connectivity in the Deepwater Snapper *Pristipomoides filamentosus* (Lutjanidae) across the Indo-Pacific with Isolation of the Hawaiian Archipelago. *PloS One* 6: e28913. doi:28910.21371/journal.pone.0028913
- Gaither M.R. & Rocha L.A.** – 2013 – Origins of species richness in the Indo-Malay-Philippine biodiversity hotspot: evidence for the centre of overlap hypothesis. *Journal of Biogeography*, 40:1638-1648.
- Gaither M.R., Toonen R.J., Robertson D.R., Planes S., Bowen B.W.** – 2010 – Genetic evaluation of marine biogeographical barriers: perspectives from two widespread Indo-Pacific snappers (*Lutjanus kasmira* and *Lutjanus fulvus*). *Journal of Biogeography*, 37: 133-147.
- Glenn T.C.** – 2011 – Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11: 759-769.

Gray W. N. – 1974 – The fishes of the Solomon Islands. Part 1: The fresh and brackish water fishes on Guadalcanal. Solomon Islands Museum Association, Honiara, Solomon.

Grant W.S. & Bowen B.W. – 1998 – Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89: 415-426.

Guindon, S. & Gascuel O. – 2003 – A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". *Systematic Biology*, 52: 696-704.

Günther D., Jackson S.E., Longerich H.P. – 1999 – Laser ablation and arc/spark solid sample introduction into inductively couple plasme spectrometers. *Spectrochimica acta, Part B*, 54: 381-409.

-H-

Hare J.A. & Cowen R.K. – 1996 – Transport mechanisms of larval and pelagic juvenile bluefish (*Pomatomus saltarix*) from South Atlantic Bight spawning grounds to Middle Atlantic Bight nursery habitats. *Limnology and Oceanography*, 41: 1264-1280.

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.

Hasting A. & Botsford L.W. – 2006 – Persistence of spatial populations depends on returning home. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103: 6067-6072.

Herre A.W. – 1927 – Gobies of the Philippines and the China Sea. Monograph 23. Bureau of Science, Manila, pp. 1-352.

Herre, A. W. – 1931 – A check list of fishes from the Solomon Islands. *J. Pan-Pac. Res. Inst.* 6(4):4-9.

Hinsinger D.D., Debruyne R., Thomas M., Denys G.P.J, Mennesson M., Utge J., Dettai A. – 2015 – Fishing for barcoding in the Torrent: from COI to complete mitogenomes on NGS platforms. *DNA Barcodes*, 3: 170-186.

Huelsenbeck J.P. & Ronquist F. – 2001 – MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754-755.

Huelsenbeck J.P., Ronquist F., Nielsen R., Bollback J.P. – 2001 – Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294: 2310-2314.

Hoareau T. – 2005 – Dynamique structurale des populations de « bichiques » (*Sicyopterus lagocephalus*), Gobiidés amphidromes de rivières de La Réunion. PhD, Université de La Réunion. 266 p.

Hoareau T.B., Bosc P., Valade P., Berrebi P. – 2007 – Gene flow and genetic structure of *Sicyopterus lagocephalus* in the south-western Indian Ocean, assessed by intron-length polymorphism. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 349: 223-234.

Hoeksema B. – 2007 – Delineation of the Indo-Malayan centre of maximum marine biodiversity: the Coral Triangle. *Biogeography, time, and place: distributions, barriers, and islands* (ed. By W. Renema), pp. 117-178. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Howland K.L., Tonn W.M., Babaluk J.A., Tallman R.F., – 2001 – Identification of freshwater and anadromous inconnu in the Mackenzie River system by analysis of otolith strontium. *Transactions of the American Fisheries Society*, 130: 725-741.

Hughes T.P., Bellwood D.R., Connolly S.R. – 2002 – Biodiversity hotspots, centre of endemism, and the conservation of coral reefs. *Ecology Letters*, 5: 775-784.

-I-

Iida M., Watanabe S. & Tsukamoto K., – 2010a – Validation of otolith daily increments in the amphidromous goby *Sicyopterus japonicus*. *Coastal Marine Science*, 34: 39-41.

Iida M., Watanabe S., Shinoda A., Tsukamoto K., – 2008 – Recruitment of the amphidromous goby *Sicyopterus japonicus* to the estuary of the Ota River, Wakayama, Japan. *Environmental Biology of Fishes*, 83: 331-341.

Iida M., Watanabe S., Yamada Y., Lord C., Keith P. & Tsukamoto K., – 2010b – Survival and behavioral characteristics of amphidromous goby larvae of *Sicyopterus japonicus* (Tanaka, 1909) during their downstream migration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 383: 17-22.

Imron J.B., Hale P., Degnan B.M., Degnan S.M. – 2007 – Pleistocene isolation and recent gene flow in *Haliotis asinina*, an Indo-Pacific vetigastropod with limited dispersal capacity. *Molecular Ecology*, 16: 289-304.

IUCN France, MNHN, SEOR, ARDA, Insectarium de La Réunion, GLOBICE & Kélonia. – 2013– La liste rouge des espèces menacées en France - Faune de la Réunion. Paris, France. <http://www.uicn.fr/Liste-rouge-faune-Reunion.html>

Iwata A. – 1989 – Genus *Eleotris*. In: Kawanabe H., Mizuno N. (eds) *Freshwater fishes of Japan* (in Japanese). Yama-Kei, Tokyo, pp 552-555.

-J-

Jenkins A. & Boseto D. – 2007 – Freshwater fishes of Tetepare Island. *Wetland international*, WWF, Honiara, Solomon.

Jukes T.H. & Cantor C.R. – 1969 – The evolution of protein molecules. In: H.M. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*, pp. 21-132, Academic Press, New York.

Jones G.P. – 1986 – Food availability affects growth in a coral reef fish. *Oecologia*, 70: 136-139.

Jones G.P., Caley M.J., Munday P.L. – 2002 – Rarity in coral reef fish communities. Coral reef fishes, dynamics and diversity in a complex ecosystem (ed. by P.F. Sale), pp. 81-101. Academic Press, San diego, CA.

-K-

Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., et al. – 2012 – Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647-1649.

Keith P. – 2003 – Biology and ecology of amphidromous Gobiidae in the Indo-Pacific and the Caribbean regions. *Journal of Fish Biology*, 63: 831-847.

Keith P., Hadiaty R.K., Lord C. – 2012 – A new species of *Belobranchus* (Teleostei: Gobioidi: Eleotridae) from Indonesia. *Cybium*, 36: 479-484.

Keith P., Hoareau T.B., Lord C., Ah-yane O., Gimmoneau G., Robinet T., Valade P. – 2008 – Characterisation of post-larval to juvenile stages, metamorphosis and recruitments of an amphidromous goby, *Sicyopterus lagocephalus* (Pallas) (Teleostei: Gobiidae: Sicydiinae). *Marine and freshwater Research*, 59: 876-889.

Keith P. & Lord C. – 2011 – Tropical freshwater gobies: Amphidromy as a life cycle (p. 243 à 277). *The biology of Gobies*. Edition Science Publishers & CRC Press. 685 p.

Keith P., Lord C., Vigneux E. – 2006 – *In vivo* observations on post-larval development of freshwater gobies and eleotrids from French Polynesia and New Caledonia. *Ichthyological Exploration Freshwaters*, 17: 187-191.

Keith P. & Marion L. – 2002 – Methodology for drawing up a Red List of threatened freshwater fish in France. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 12: 169-179.

Keith P., Marquet G., Gerbeau P., Vigneux E., Lord C. – 2013 – Poissons et crustacés d'eau douce de Polynésie. *Société Française d'Ichtyologie*, Paris, 282 p.

Keith P., Marquet G., Lord C., Kalfatak D., Vigneux E. – 2010 – Poissons et crustacés d'eau douce du Vanuatu. *Société Française d'Ichtyologie ed.*, Paris.

Keith P., Marquet G., Watson R.E. – 2007 – *Stiphodon kalfatak*, a new species of freshwater goby from Vanuatu (Teleostei: Gobioidi: Sicydiinae). *Cybium*, 31: 33–37.

Keith P., Vigneux E., Bosc P. – 1999 – Atlas des poissons et crustacés d'eau douce de la Réunion. *Muséum national d'Histoire naturelle*, Paris, 136 p. (Patrimoines naturels, 39).

- Kerr L.A., Cadrin S.X., Secor S.D.** – 2010 – The role of the spatial dynamics in the stability, resilience and productivity of an estuarine fish population. *Ecological Applications*, 20: 497-507.
- Keyse J., Crandall E.D., Toonen R.J., Meyer C.P., Tremi E.A. Riginos C.** – 2014 – The scope of published population genetic data for Indo-Pacific marine fauna and future research opportunities in the region. *Bulletin of Marine Science*, 90: 47-78.
- Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Pääbo S., Villablanca F.X., et al.** – 1989 – Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers, *Proceeding of National Academic Sciences USA*, 86: 6196-200.
- Kottelat M.** – 2013 – The Fishes of the Inland Waters of Southeast Asia: A Catalogue and Core Bibliography of the Fishes Known to Occur in Freshwaters, Mangroves and Estuaries. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 27:1-663.
- Kuo S.R. & Shao K.T.** – 1999 – Species composition of fish in the coastal zones of the Tsengwen Estuary, with descriptions of five new records from Taiwan. *Zoological Studies*, 38: 391-404.

-L-

- Ladd H.S.** – 1960 – Origin of the Pacific island molluscan fauna. *American Journal of Science*, 258: 137-150.
- Lanfear R., Calcott B., Ho S.Y.W., Guindon S.** – 2012 – PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29: 1695-1701.
- Laroche J.L., Richardson S.L., Rosenberg A.A.** – 1982 – Age and growth of a pleuronectid, *Parophrys vetulus*, during the pelagic larval period in Oregon coastal waters. *Fishery Bulletin*, 80: 93-104.
- Lecomte-Finiger R.** – 1999 – L'otolithe : “la boîte noire” des Téléostéens. *L'Année Biologique*, 38: 107-122.
- Leis J.M. & McCormick M.I.** – 2002 – The biology, behaviour and ecology of the pelagic, larval stage of coral reef fishes. In: *Coral Reef Fishes: Dynamics and Diversity in a Complex Ecosystem*. Elsevier Science, San Diego (USA), pp. 171.
- Leprieur F., Descombes P., Gaboriau T. et al.** – 2016 – Plate tectonics drive tropical reef biodiversity dynamics. *Nature communication*, 7: 11461.

- Lessios H.** – 1998 – The first stage of speciation as seen in organisms separated by the Isthmus of Panama. Howard D.J., Berlocher S.H. (eds) *Endless forms: species and speciation*. Oxford University Press, Oxford.
- Levin L.A.** – 2006 – Recent progress in understanding larval dispersal: new directions and disgressions. *Intergrative and Comparative Biology*, 46: 282-297.
- Lewis P.O.** – 2001 – Phylogenetic systematics turns over a new leaf. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 30-37.
- Librado P. & Rozas J.** – 2009 – Dnasp v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451.
- Liu H., Mao X.L., Mao S.S., Zeng X., Greif R., Russo R.E.** – 2004 – Nanosecond and femtosecond laser ablation of brass: particulate ICP-MS measurements. *Analytical Chemistry*, 76: 379-383.
- Lord C., Brun C., Hauteceœur M., Keith P.** – 2010 – Insights on endemism: comparison of the duration of the marine larval phase estimated by otolith microstructural analysis of three amphidromous *Sicyopterus* species (Gobioidei: Sicydiinae) from Vanuatu and New Caledonia. *Ecology of Freshwater Fish*, 19: 26-38.
- Lord C., Lorion J., Dettai A., Watanabe S., Tsukamoto K., Cruaud C., Keith P.** – 2012 – From endemism to widespread distribution: phylogeography of three amphidromous *Sicyopterus* species (Teleostei: Gobioidei: Sicydiinae). *Marine Ecology Progress Series*, 455: 269-285.
- Lord C., Tabouret H., Claverie F., Pécheyran C. & Keith P.** – 2011 – Femtosecond laser ablation ICP-MS measurement of otolith Sr:Ca and Ba:Ca composition reveal differential use of freshwater habitats from three amphidromous *Sicyopterus* (Teleostei: Gobioidei: Sicydiinae) species. *Journal of Fish Biology*, 79: 1304-1321.
- Ludt W.B. & Rocha L.A.** – 2015 – Shifting seas: the impacts of Pleistocene sea-level fluctuations on the evolution of tropical marine taxa. *Journal of Biogeography*, 42: 25-38.
- Luiz O.J., Allen A.P., Robertson D.R., Floeter S.R., et al.** – 2013 – Adult and larval traits as determinants of geography range size among tropical reef fishes. *Proceedings of National Academy of Science of the USA*, 110: 16498-16502.

-M-

- Macleay W.** – 1879 – Notes on some fishes from the Solomon Islands. *Proceeding of the Linnean Society of New South Wales*, 4: 60-64.

- Maeda K. & Tachihara K.** – 2004 – Instream distributions and feeding habits of two species of sleeper, *Eleotris acanthopoma* and *Eleotris fusca* in the Teima river, Okinawa Island. Ichthyological Research, 51:233-240.
- Maeda K. & Tachihara K.** – 2005 – Recruitment of amphidromous sleepers *Eleotris acanthopoma*, *Eleotris melanosoma*, and *Eleotris fusca* into the Teima river, Okinawa Island. Ichthyological Research 52:325-335.
- Maeda K. & Tachihara K.** – 2006 – Fish fauna in the Teima Stream, Okinawa island. Biological Magazine Okinawa, 44: 7-25.
- Maeda K. & Tachihara K.** – 2010 – Diel and seasonal occurrence patterns of drifting fish larvae in the Teima Stream, Okinawa Island. Pacific Science, 64: 161-176.
- Maeda K., Yamasaki N., Tachihara K.** – 2007 – Size and age at recruitment and spawning season of sleeper, genus *Eleotris* (Teleostei: Eleotridae) on Okinawa Island, southern japan. Raffles Bulletin of Zoology, supplement, 14: 199-207.
- Maeda K., Yamasaki N., Kondo M., Tachihara K.** – 2008 – Reproductive biology and early development of two species of sleepers, *Eleotris acanthopoma* and *Eleotris fusca* (Teleostei: Eleotridae). Pacific Science, 62: 327-340.
- Malay M.C.M.D & Paulay G.** – 2010 – Peripatric speciation drives diversification and distributional pattern of reef hermit crabs (Decapoda: Diogenidae: *Calcinus*). Evolution, 64: 634-662.
- Martinez E., Ganachaud A., Lefevre J., Maamaatuaiahutapu K.** – 2009 – Central South Pacific thermocline water circulation from a high-resolution ocean model validated against satellite data: Seasonal variability and El Niño 1997-1998 influence. Journal of Geophysical Research, 114: C05012, doi:10.1029/2008JC004824.
- Matile L., Tassy P., Goujet D.** – 1987 – Introduction à la systématique zoologique. Biosystema 1, Société française de systématique (Paris).
- McCormick M.I. & Molony B.W.** – 1995 – Influence of water temperature during the larval stage on size, age and body condition of tropical reef fish at settlement. Marine Ecology Progress Series, 19: 26-38.
- McDowall R.M.** – 1992 – Diadromy: origins and definition of terminology. Copeia, 1: 248-251.
- McDowall R.M.** – 2007 – On amphidromy, a distinct form of diadromy in aquatic organisms. Fish and Fisheries, 8: 1-13.

- McDowall R.M., Mitchell C.P., Brothers E.B.** – 1994 – Age at migration from the sea of juvenile Galaxias in New Zealand (Pisces: Galaxiidae). *Bulletin of Marine Science*, 54: 385-402.
- Mennesson M.I., Tabouret H., Pécheyran C. Feunteun E., Keith P.** – 2015 – Amphidromous life cycle of *Eleotris fusca* (Gobioidea: Eleotridae), a widespread species from the Indo-Pacific studied by otolith analysis. *Cybium*, 39: 249-260.
- Mennesson M.I., Keith P., Ebner B.C., Gerbeaux P.** – 2016 – *Eleotris bosetoi* (Teleostei: Gobioidei: Eleotridae) a new species of freshwater fish from the Solomon Islands. *Pacific Science*, *in press*.
- Mennesson M.I. & Keith P.** – *submitted* – Molecular evidence of two species of the *Eleotris fusca* cephalic free neuromast pattern group (Teleostei: Gobioidei: Eleotridae) in the Indian Ocean.
- Mennesson M.I., Bonillo C., Keith P.** – *submitted* – Phylogeography of *Eleotris fusca* (Teleostei: Gobioidei: Eleotridae) in the Indo-Pacific area reveals a cryptic species in the Indian Ocean.
- Miller P.J., & Wongrat P.** – 1991 – The innervation of head neuromast rows in eleotridine gobies (Teleostei:Gobioidei). *Journal of Zoology*, 225: 27-42.
- Milton D., Halliday I., Sellin M., Marsh R., Staunton-smith J., Woodhead J.** – 2008 – The effect of habitat and environmental history on otolith chemistry of barramundi *Lates calcarifer* in estuarine populations of regulated tropical river. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 78: 301-315.
- Mirams A.G.K., Treml E.A., Shields J.L., Liggins L., Riginos C.** – 2011 – Vicariance and dispersal across an intermittent barrier: population genetic structure of marine animals across the Torres Strait land bridge. *Coral Reefs*, 30: 937-949.
- Miya M., Takeshima H., Endo H., Ishiguro N.B., Inoue J.G., Mukai T., Satoh T.P., Yamaguchi M., Kawaguchi A., Mabuchi K., Shirai S.M., Nishida M.** – 2003 – Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 26: 121-138.
- Mora C., Treml E.A., Roberts J., Crosby K., Roy D., Tittensor D.P.** – 2012 – High connectivity among habitats precludes the relationship between dispersal and range size in tropical reef fishes. *Ecography*, 35: 89-96.
- Morales-Nin B.** – 1987 – Ultrastructure of the organic and inorganic constituents of the otoliths of the sea bass. The age and growth of fish, pp. 331-343.

Mouillot D., De Bortoli J., Leprieur F., Parravicini V., Kulbicki M., Bellwood D.R. – 2013 – The challenge of delineating biogeographical regions : nestedness matters for Indo-Pacific coral reef fishes. *Journal of Biogeography*, 40: 2228-2237.

Morley R.J. – 2000 – *Origin and Evolution of Tropical Rain Forests*. Chichester, UK: John Wiley & Sons. 362 pp.

Murphy C.A. & Cowan J.H. Jr. – 2007 – Production, marine larval retention or dispersal, and recruitment of amphidromous Hawaiian gobioids: issues and implications. In: *Biology of Hawaiian Streams and Estuaries* (Evenhuis N.L. & Fitzsimons J.M., eds). Bishop Museum Bulletins in Cultural Environmental Studies, 3: 63-74.

Myers G.S. – 1949 – Usage of anadromous, catadromous and allied terms for migratory fishes. *Copeia*, 2: 89-97.

-N-

Nelson S.G., Parham J.E., Tibatts R.B., Camacho F.A., Lebere T., Smith B.D. – 1997 – Distribution and microhabitats of the amphidromous gobies in streams of Micronesia. *Micronesica*, 30: 83-91.

Nordlie F.G. – 1979 – Niche specificities of eleotrid fishes in a tropical estuary. *Revista de Biología Tropical*, 27: 35-50.

Nordlie F.G. – 1981 – Feeding and reproduction biology of eleotrid fishes in a tropical estuary. *Journal of Fish Biology*, 18: 97-110.

-P-

Padial J.M., Miralles A., De la Riva I., Vences M. – 2010 – The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7: 1-16.

Page T.J., Toratis L.S., Cook B.D., Binderup A., et al. – 2013 – Invertébrés sans frontières: Large scales of connectivity of selected freshwater species among Caribbean Islands. *Biotropica*, 45: 236-244.

Panfili J., De Pontual H., Troadec H., Wright P. J. – 2002 – *Manuel de sclérochronologie des poissons*. Co-Edition Ifremer-IRD, Brest. 464 p.

Pannella G. – 1971 – Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science*, 173: 1124-1127

Pante E., Puillandre N., Viricel A., Arnaud-haond S., Aurelle D., Castelin M., Chenail A., Destombe C., Forcioli D., Valero M., Viard F., Samadi S. – 2015a – Species are hypotheses: avoid connectivity assessments based on pillars of sand. *Molecular Ecology*, 24: 525-544.

- Pante E., Schoelinck S., Puillandre N.** – 2015b – From Integrative Taxonomy to Species Description: One Step Beyond. *Systematic Biology*, 64: 152-160.
- Perini V.R., De Carvalho D.C., Beheregaray L.B., Prosdocimi F.** – 2016 – The complete mitochondrial genome of the southern purple-spotted gudgeon *Mogurnda adspersa* (Perciformes: Eleotridae) through pyrosequencing. *Mitochondrial DNA, Part A: DNA Mapping, Sequencing and Analysis*, 27: 380-2.
- Pezold F. & Cage B.** – 2001 – A review of the spinycheek sleepers, genus *Eleotris* (Teleostei: Eleotridae), of the western hemisphere, with comparison to the West African species. *Tulane Studies in Zoology and Botany*, 31: 1-44.
- Planes S.** – 1993 – Genetic differentiation in relation to restricted larval dispersal of the convict surgeonfish *Acanthurus triostegus* in French Polynesia. *Mar. Ecol.* 98, 237–246.
- Planes S. & Fauvelot C.** – 2002 – Isolation by distance and vicariance drive genetic structure of a coral reef fish in the Pacific Ocean. *The Society for the study of Evolution*, 56: 378-399.
- Planes S. & Galzin R.** – 1997 – New perspectives in biogeography of coral reef fish in the Pacific using phylogeography and population genetics approaches. *Vie et Milieu*, 47: 375-380.
- Polhemus, D.A., Englund R.A., Allen G. R., Boseto D., Polhemus J.T.** – 2008 – Freshwater Biotas of the Solomon Islands Analysis of Richness, Endemism and Threats Pacific Biological Survey Bishop Museum. Bishop Museum Technical Report 45 Bishop Museum Press, Honolulu, Hawai'i.
- Posada D. & Crandall K.A.** – 2001 –Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology*, 50: 580-601.
- Pous S., Feunteun E., Ellien C.** – 2010 – Investigation of tropical eel spawning area in the South-Western Indian Ocean: Influence of the oceanic circulation. *Progress in Oceanography*, 86: 396-413.

-R-

- R Development Core Team.** – 2014 – R: a language and environment for statistical computing. (R Foundation for Statistical Computing, Vienna). Available at <http://www.R-project.org>
- Radtke R.L. & Kinzie R.A III.** – 1996 – Evidence of a marine larval stage in endemic Hawaiian stream gobies from isolated high-elevation locations. *Transactions of the American Fisheries Society*, 125: 613–621.

- Radtke R.L., Kinzie R.A. III, Folsom S.D.** – 1988 – Age at recruitment of Hawaiian freshwater gobies. *Environmental Biology of Fishes*, 23: 205-213.
- Radtke R.L., Kinzie R.A. III., Shafer D.J.** – 2001 – Temporal and spatial variation in length of larval life and size at settlement of the Hawaiian amphidromous goby *Lentipes concolor*. *Journal of Fish Biology*, 59: 928-938.
- Rambaut A.** – 2007 – FigTree v1.3.1. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rambaut A., Drummond A.J.** – 2007 – Tracer v1.4 Available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Reece J., Bowen B., Smith D. Larson A.** – 2011 – Comparative phylogeography of four Indo-Pacific moray eel species (Muraenidae) reveals comparable ocean-wide genetic connectivity despite five-fold differences in available adult habitat. *Marine Ecology Progress Series*, 437: 269-277.
- Renema W., Bellwood D.R., Braga J.C. et al.** – 2008 – Hopping hotspots: global shifts in marine biodiversity. *Science*, 321: 654-657.
- Réveillac E., Feunteun E., Berrebi P., Gagnaire P.A., Lecomte-Finiger R., Bosc P., Robinet T.** – 2008 – *Anguilla marmorata* larval migration plasticity as revealed by otolith microstructural analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65: 2127-2137.
- Resh V.H., Moser M., Poole M.** – 1999 – Feeding habits of some freshwater fishes in streams of Moorea, French Polynesia. *Annales de Limnologie*, 35: 205-210.
- Riddle B.R.** – 2009 – What is modern biogeography without phylogeography? *Journal of Biogeographie*, 11: 353-361.
- Riginos C. & Victor BC.** – 2001 – Larval spatial distributions and other early life-history characteristics predict genetic differentiation in Eastern Pacific Blennioids fishes. *Proceeding of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 286: 1931-1936.
- Roberts C.M., McClean C.J., Veron J.E.N. et al.** – 2002 – Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. *Science*, 295: 1280-1284.
- Ronquist F., Teslenko M., Van der Mark P., et al.** – 2012 – MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 61:1-4.

-S-

- Sanzo L.** – 1911 – Distribuzione delle papille cutanee (organiciatiforme) e suo val ore sistematico nei gobi. *Mitt. Zool. Stn. Neapel*, 20: 249-328.
- Sathiamurthy E. & Voris H.K.** – 2006 – Maps of Holocene sea level transgression and submerged lakes on the Sunda Shelf. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University*, 2: 1-43.
- Santini F. & Winterbottom R.** – 2002 – Historical biogeography of Indo-western Pacific coral reef biota: is the Indonesian region a centre of origin? *Journal of Biogeography*, 29: 189-205.
- Secor D. H., Dean J.M., Campana S.E.** – 1992 – Otolith removal and preparation for microstructural examination. In: *Otolith microstructure examination and analysis* Stevenson D. K., Campana S. E. (eds.). Ottawa, Canada: Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences. 117: 19-57.
- Schwarz G.E.** – 1978 – Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*, 6: 461-464.
- Shafer D.J.** – 2000 – Evaluation of periodic and aperiodic otolith structure and somatic-otolith scaling for use in retrospective life history analysis of a tropical marine goby, *Bathygobius coalitus*. *Marine Ecology Progress Series*, 199: 217-229.
- Shen K.N., Lee Y.C., Tzeng W.N.** – 1998 – Use of otolith microchemistry to investigate the life history pattern of gobies in a Taiwanese stream. *Zoology Studies*, 37: 322-329.
- Shen K.N., Lee Y.C., Tzeng W.N.** – 2002 – Formation of metamorphosis check in otolith of the amphidromous goby *Sicyopterus japonicus*. *Marine Ecology Progress Series*, 228: 205-211.
- Shiao J.C., Ložys L., Iizuka Y., Tzeng W.N.** – 2006 – Migratory patterns and contribution of stocking to the population of European eel in Lithuanian waters as indicated by otolith Sr:Ca ratios. *Journal of Fish Biology*, 69: 749-769.
- Shiao J.C., Tzeng CS., Li P.C., Bell K.N.I.** – 2015 – Upstream migration and marine early life history of amphidromous gobies inferred from otolith increments and microchemistry. *Environmental Biology of Fishes*, 98: 933-950.
- Sirot C.** – 2009 – Analyse comparative d'otolithes de poissons amphidromes de milieu tropical insulaire : Recherche d'indicateurs de qualité des habitats traversés. Master degree dissertation, Master de Sciences et Technologie, France.
- Souchon Y. & Keith P.** – 2002 – Freshwater fish habitat: science, management and conservation in France. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 4: 401-412.

Sotka E.E. – 2012 – Natural selection, larval dispersal, and geography of phenotype in the sea. *Integrative and Comparative Biology*, 52: 538-545.

Spalding M.D., Fox H.E., Halpern B.S., McManus M.A., Molnar J., Allen G.R., Davidson N., Jorge Z.A., Lombana A.L., Lourie S.A., et al. – 2007 – Marine ecoregions of the world: a bioregionalization of coastal and shelf areas. *Bioscience*, 57: 573-583.

Szabó Z., Smelgrove B., Craig M.T., Rocha L.A., Bowen B.W. – 2014 – Phylogeography of the manybar goatfish, *Parupeneus multifasciatus*, reveals isolation of the Hawaiian Archipelago and a cryptic species in the Marquesas Islands. *Bulletin of Marine Science*, 90: 493-512.

-T-

Tabouret H. – 2009 – Recherche des marqueurs d'exposition aux contaminants et fréquentation des habitats chez l'anguille *Anguilla anguilla* de l'estuaire de l'Adour : de la réponse moléculaire à la microchimie de l'otolithe. Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, spécialité Environnement et Matériaux. 318 pp.

Tabouret H., Bareille G., Claverie F., Pécheyran C., Prouzet P., Donard O.F.X. – 2010 – Simultaneous use of strontium:calcium and barium:calcium ratios in otoliths as markers of habitat: application to the European eel (*Anguilla anguilla*) in the Adour basin, South West France. *Marine Environmental Research*, 70: 35-45.

Tabouret H., Lord C., Bareille G., Pécheyran C., Monti D. – 2011 – Otolith microchemistry in *Sicydium punctatum*: indices of environmental condition changes after recruitment. *Aquatic Living Resources*, 24: 369-378.

Taillebois L., Castelin M., Oviden JR., Bonillo C., Keith P. – 2013 – Contrasting Genetic Structure among Populations of Two Amphidromous Fish Species (Sicydiinae) in the Central West Pacific. *Plos One*, 8(10):e75465.

Taillebois L., Maeda K., Vigne S. & Keith P. – 2012 – Pelagic larval duration of three amphidromous Sicydiinae gobies (Teleostei: Gobioidae) including widespread and endemic species. *Ecology of Freshwater Fish*, 21: 552-559.

Taillebois L., Tabouret H., Pecheyran C., Keith P. – 2015 – Inputs from microchemistry to the understanding of three Sicydiinae species life cycle. *Vie et Milieu*, 65: 73-84.

Teichert N., Valade P., Grondin H., Trichet E., Sardenne F., Gaudin P. – 2014 – Pelagic larval traits of the amphidromous goby *Sicyopterus lagocephalus* display seasonal variations related to temperature in La Réunion Island. *Ecology Freshwater Fish*, doi: 10.1111/eff.12205.

- Teixeira R.L.** – 1994 – Abundance, reproductive period and feeding habits of eleotrid fishes in estuarine habitats of north-east Brazil. *Journal of Fish Biology*, 45: 749-761.
- Timm J., Figiel M., Kochzius M.** – 2008 – Contrasting patterns in species boundaries and evolution of anemonefishes (Amphiprioninae, Pomacentridae) in the centre of marine biodiversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 268-276.
- Tornabene L., Valdez S., Erdmann M., Pezold F.** – 2015 – Support for a ‘Center of Origin’ in the Coral Triangle: Cryptic diversity, recent speciation, and local endemism in a diverse lineage of reef fishes (Gobiidae: Eviota). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82:200-210.
- Tzeng W.N.** – 1996 – Effects of salinity and ontogenetic movements on strontium: calcium ratios in the otoliths of the Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 199: 111-122.
- Tzeng W.N. & Yu S.Y.** – 1988 – Daily growth increments in otoliths of milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal), larvae. *Journal of Fish Biology*, 32: 495-504.

-V-

- Valade P.** – 2001 – Etude de la reproduction et des premiers stades larvaires du cabot bouche-ronde de l’île de La Réunion en vue de la conception d’aménagements et de mesures de gestion favorisant le franchissement des ouvrages de captage d’eau par les larves lors de la migration d’avalaison. PhD dissertation, Université de Montpellier II.
- Van der Kaars W.A. & Dam M.A.C.** – 1995 – A 135,000-years record of vegetational and climatic change from the Bandung area, West Java, Indonesia. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 117: 55-72.
- Veron J.E.N., Devantier L.M., Turak E., Green A.L., Kininmonth S., Stafford-Smith M., Peterson N.** – 2009 – Delineating the coral triangle. *Galaxea, Journal of Coral Reef Studies*, 11: 91-100.
- Victor B.C. & Wellington G.M.** – 2000 – Endemism and pelagic larval duration of reef fishes in the Eastern Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 205: 241-248.
- Vivier L., Cyrus D.P., Jerling H.L.** – 2010 – Fish community structure of the St Lucia Estuarine System under prolonged drought conditions and its potential for recovery after mouth breaching. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 86: 568-579.
- Voris H.K.** – 2000 – Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. *Journal of Biogeography*, 27: 1153-1167.

-W-

- Wang H.Y., Tsai, M.P., Dean J., Lee, S.C.** – 2001 – Molecular phylogeny of gobioid fishes (Perciformes: Gobioidae) based on mitochondrial 12S rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20: 390-408.
- Watabe N., Tanaka K., Yamada J., Dean J.M.** – 1982 – Scanning electron microscope observations of the organic matrix in the otolith of the teleost fish *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus) and *Tilapia nilotica* (Linnaeus). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 58: 127-134.
- Watson R.E., Keith P., Marquet G.** – 2007 – *Akihito vanuatu*, a new genus and new species of freshwater goby from the South Pacific (Teleostei: Gobioidae: Sicydiinae). *Cybium*, 31: 341-349.
- Wei T., Jin X.X., Xu T.J.** – 2013 – The first complete mitochondrial genome from *Bostrychus* genus (*Bostrychus sinensis*) and partitioned Bayesian analysis of Eleotridae fish phylogeny. *Journal of Genetics*, 92: 247-257.
- Weersing K. & Toonen R.J.** – 2009 – Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series*, 393: 1-12.
- White C., Selkoe K.A., Watson J., Siegle D.A., Zacherl D.C., Toonen R.J.** – 2010 – Ocean currents help explain population genetic structure. *Proceedings of the Royal Society B Biology Science*, 277: 1685-1694.
- Wiley E.O. & Mayden R.L.** – 2000 – The evolutionary species concept. In: *Species concepts and phylogenetic theory – a debate* (Q.D. Wheeler & R. Meier, Eds.), pp. 70-89, New York: Columbia University Press.
- Will K.W., Mishler B.D., Wheeler Q.D.** – 2005 – The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy. *Systematic Biology*, 54: 844-851.
- Williams S.T. & Reid D.G.** – 2004 – Speciation and diversity on tropical rocky shores: global phylogeny of snails of the genus *Echinolittorina*. *Evolution*, 58: 2227-2251.
- Woodruff D.S. & Turner L.M.** – 2009 – The Indochinese-Sundaic zoogeographic transition: a description and analysis of terrestrial mammal species distribution. *Journal of Biogeography*, 36: 803-821.
- Wright S.** – 1951 – *An essay in modal logic*. North-Holland Publishing Company.
- Wright S.** – 1965 – The interpretation of population structure by f-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395-420.

Wyrтки K. – 1973 – Physical Oceanography of the Indian Ocean. In: National Science Foundation. Washington (ed.) The biology of the Indian Ocean. Series Title: Ecological Studies. Vol. 3. Springer-Verlag, Berlin, pp18-36.

-X-

Xia A., Zhong L., Chen X., Bian W., Zhang T., Shi Y. – 2015 – Complete mitochondrial genome of spined sleeper *Eleotris oxycephala* (Perciformes, Eleotridae) and phylogenetic consideration. *Biochemical Systematics and Ecology*, 62: 11-19.

-Y-

Yamasaki N., Kondo M., Maeda K., Tachihara K. – 2011 – Reproductive biology of three amphidromous gobies, *Sicyopterus japonicus*, *Awaous melanocephalus*, and *Stenogobius sp.*, on Okinawa Island. *Cybiurn*, 35:345-359.

Yamasaki N., Maeda K., Tachihara K. – 2007 – Pelagic larval duration and morphology at recruitment of *Stiphodon percnopterygionus* (Gobiidae: Sicydiinae). *Raffles Bulletin of Zoology Supplement*, 14: 209-214.

Yang Z. – 1994 – Estimating the pattern of nucleotide substitution. *Journal of Molecular Evolution*, 39: 105-111.

-Z-

Zachos J., Pagani M., Sloan L., Thomas E., Billups K. – 2001 – Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, 292: 686-693.

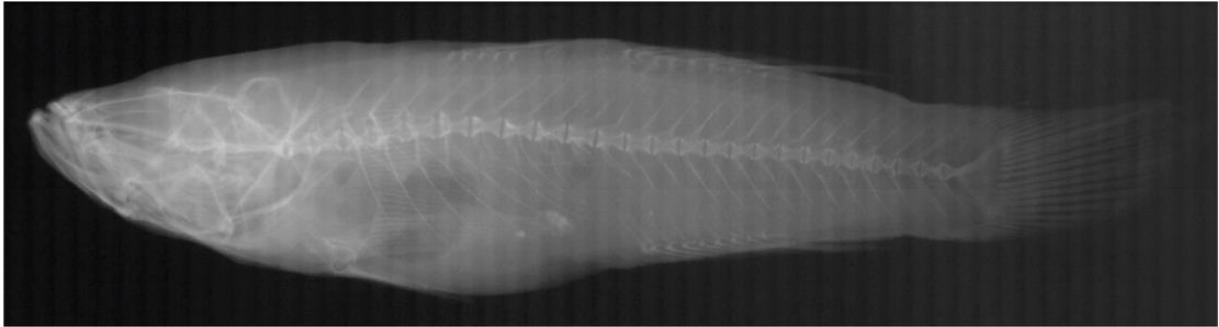
Zang X., Yin D., Wang R., Yin S., Tao P., Chen J., Zhang G. – 2016 – Complete mitochondrial DNA sequence and phylogenetic analysis of *Oxyeleotris lineolatus* (Perciformes, Eleotridae). *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing and Analysis*, 27: 2414-2416.

Annexe 1 : Planches de radiographies de vertèbres d'*Eleotris* de l'Indo-Pacifique

Eleotris fornasini - BMNH 1852.9.13.179 - **Holotype**

Nombre de vertèbres : 24

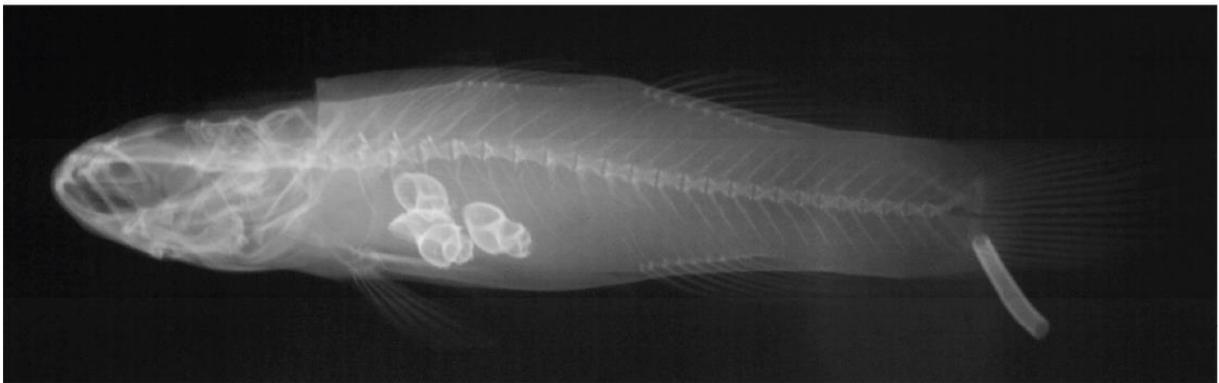
LS : 101,9 mm



Eleotris fusca - 16019 - Micronésie

Nombre de vertèbres : 24

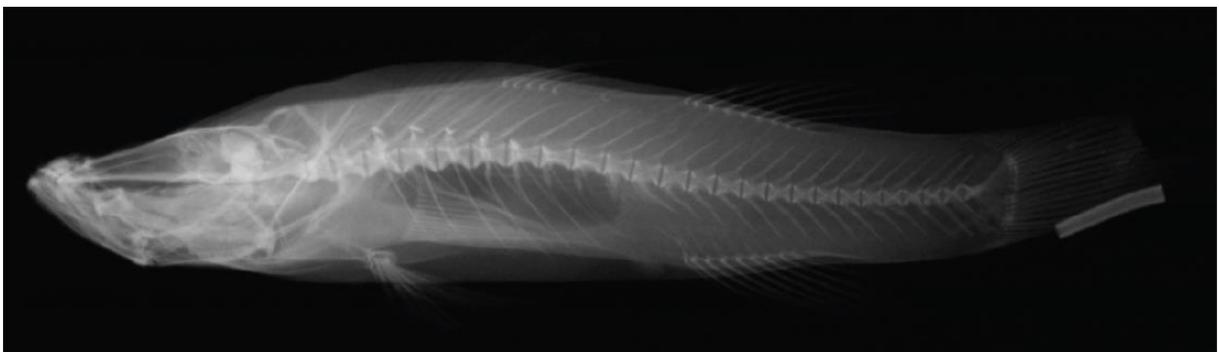
LS : 79,1 mm



Eleotris bosetoi - MNHN 2015-0328 - **Holotype**

Nombre de vertèbres : 24

LS : 101,6 mm

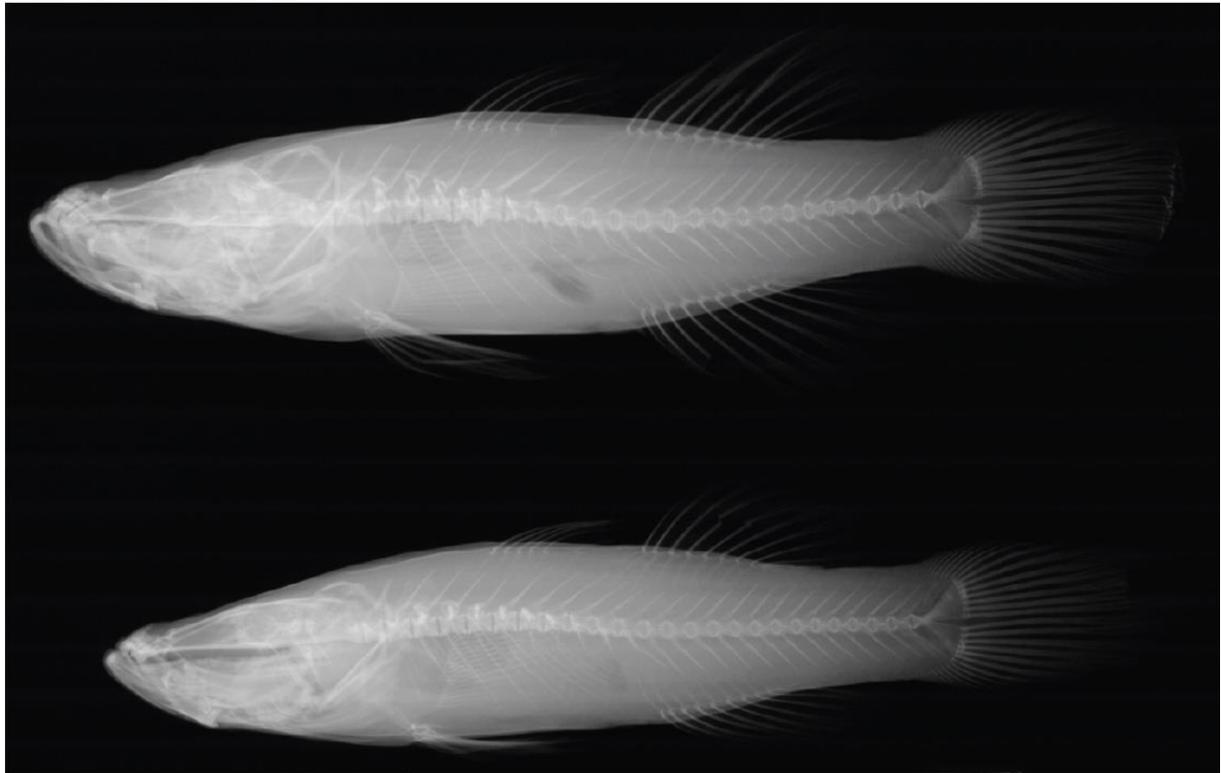


Annexe 1 : Comptage des vertèbres d'*Eleotris* à partir de radios prises aux Rayons X

Eleotris aquadulcis - WAM 29608.002 - **Paratypes**

Nombre de vertèbres : 24

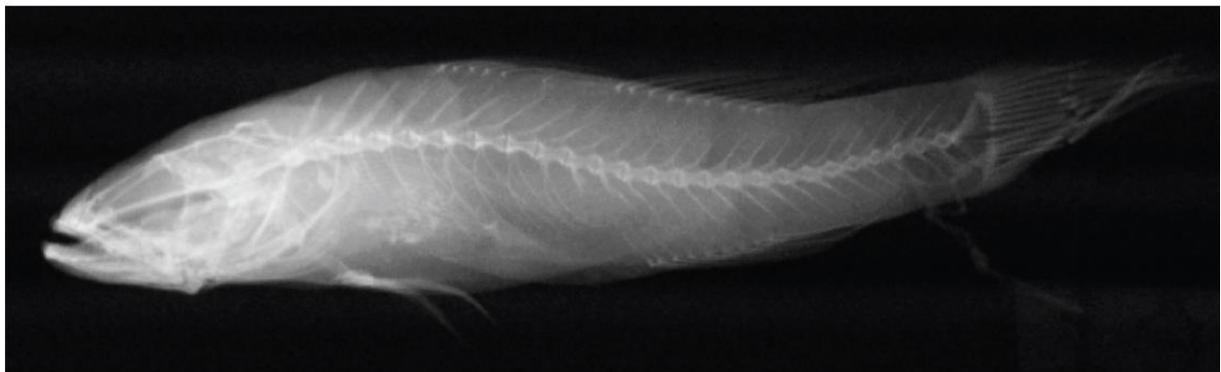
LS : 153,5 et 165,9 mm



Eleotris pellegrini - MNHN 1932-0108 - **Syntype**

Nombre de vertèbres : 24

LS : 71,5 mm

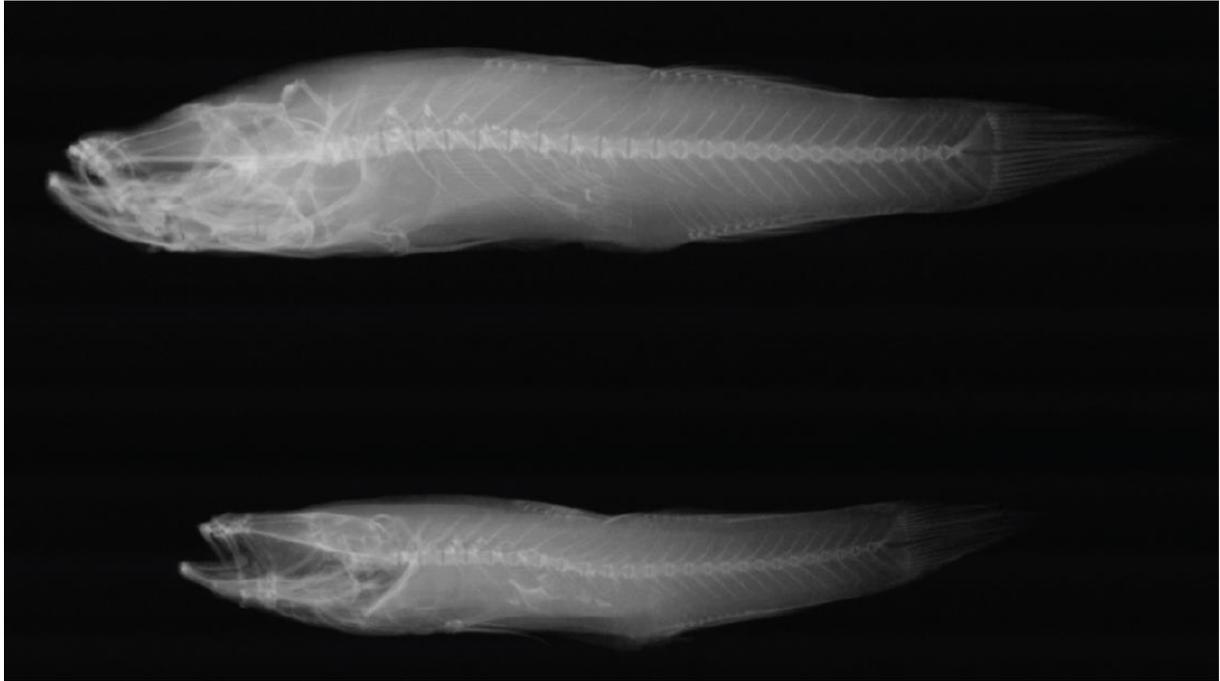


Annexe 1 : Comptage des vertèbres d'*Eleotris* à partir de radios prises aux Rayons X

Eleotris eigenmanni - SMF 6595-6599 - **Paralectotypes**

Nombre de vertèbres : 24

LS : 123,6 et 96 mm



Eleotris vomerodentata - MNHN 1984-0803 - **Holotype**

Nombre de vertèbres : 24

LS : 56,6 mm

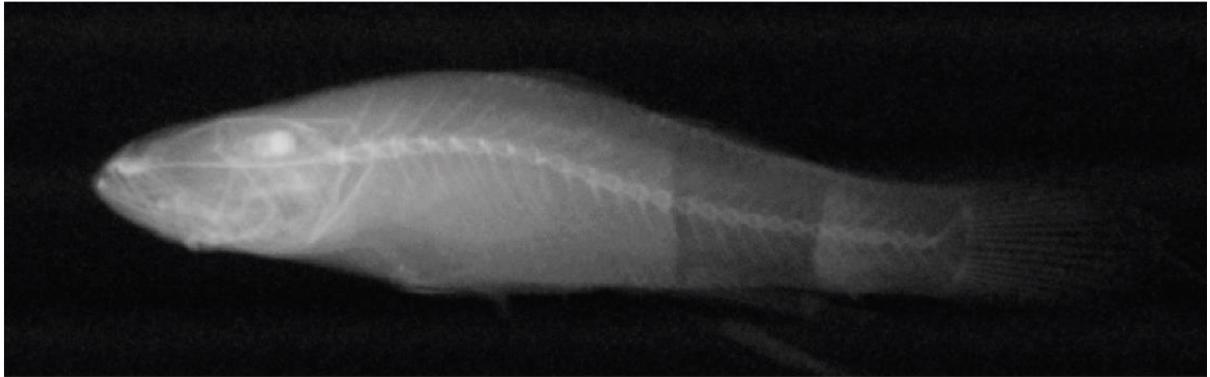


Annexe 1 : Comptage des vertèbres d'*Eleotris* à partir de radios prises aux Rayons X

Eleotris melanosoma - BIF 0307 - Indonésie

Nombre de vertèbres : 24

LS : 53,8 mm



Eleotris melanosoma - BIF 0309 - Indonésie

Nombre de vertèbres : 24

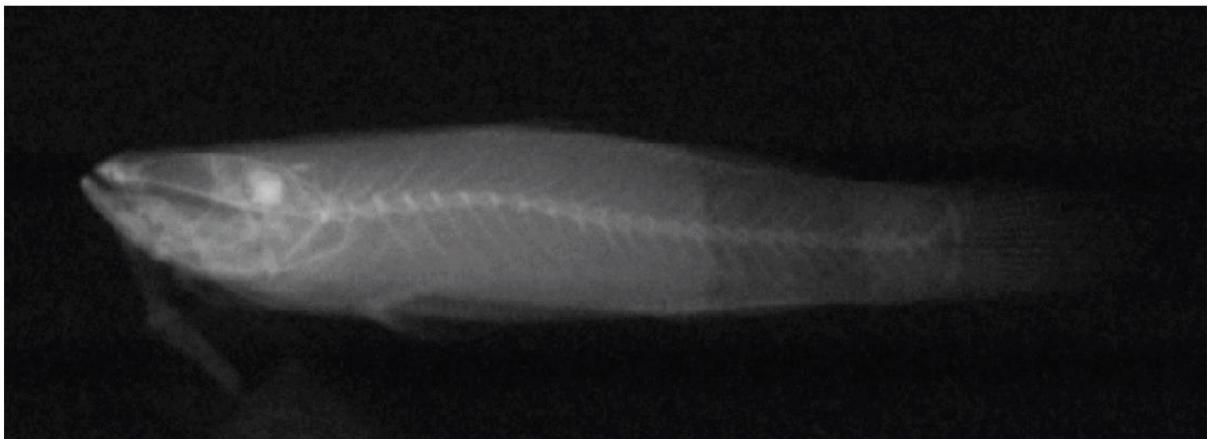
LS : 58,8 mm



Eleotris melanosoma - BIF 1567 - Indonésie

Nombre de vertèbres : 24

LS : 43,5 mm

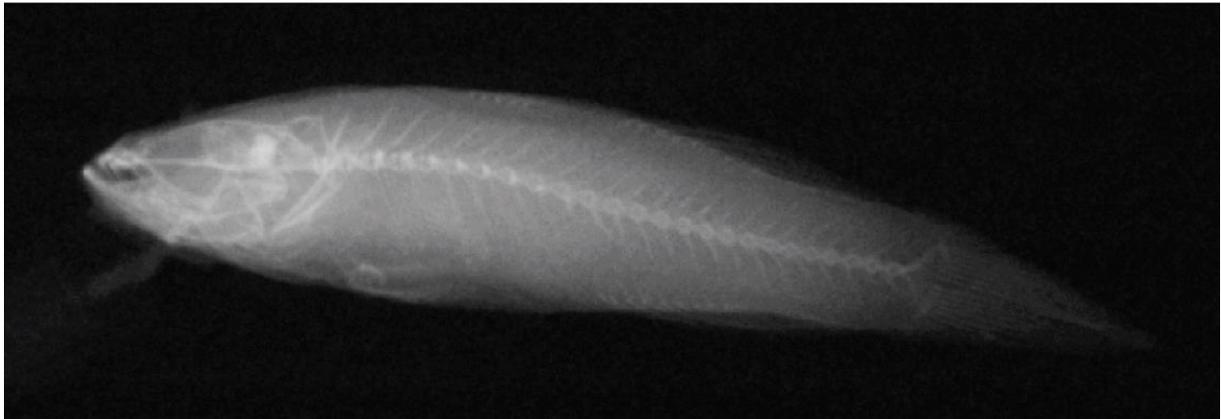


Annexe 1 : Comptage des vertèbres d'*Eleotris* à partir de radios prises aux Rayons X

Eleotris melanosoma - BIF 2169 - Indonésie

Nombre de vertèbres : 24

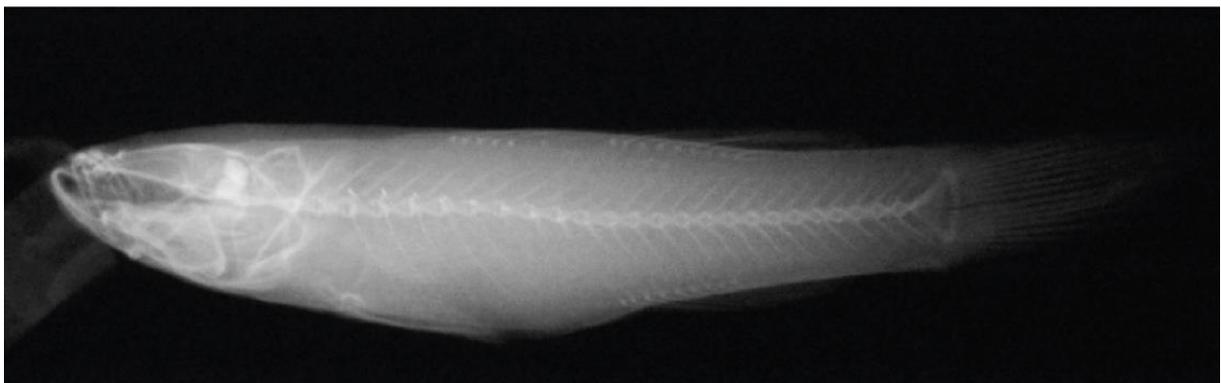
LS : 55 mm



Eleotris melanosoma - BIF 2784 - Indonésie

Nombre de vertèbres : 24

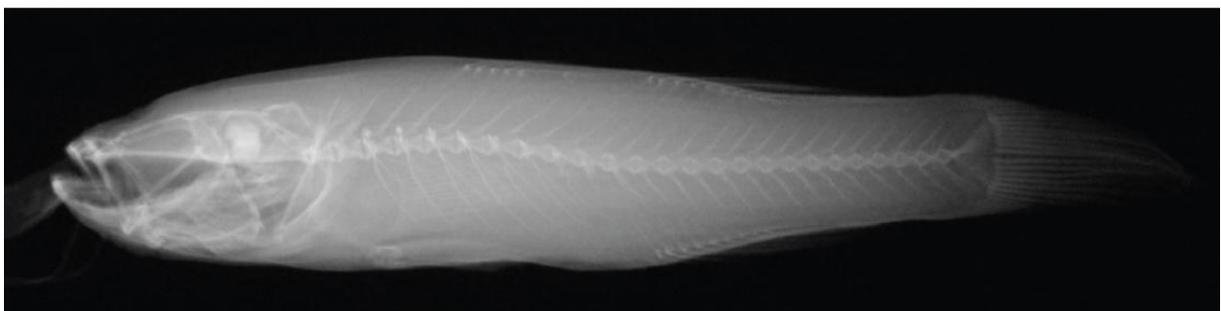
LS : 69 mm



Eleotris cf. melanosoma - BIF 2782 - Indonésie

Nombre de vertèbres : 24

LS : 86,4 mm

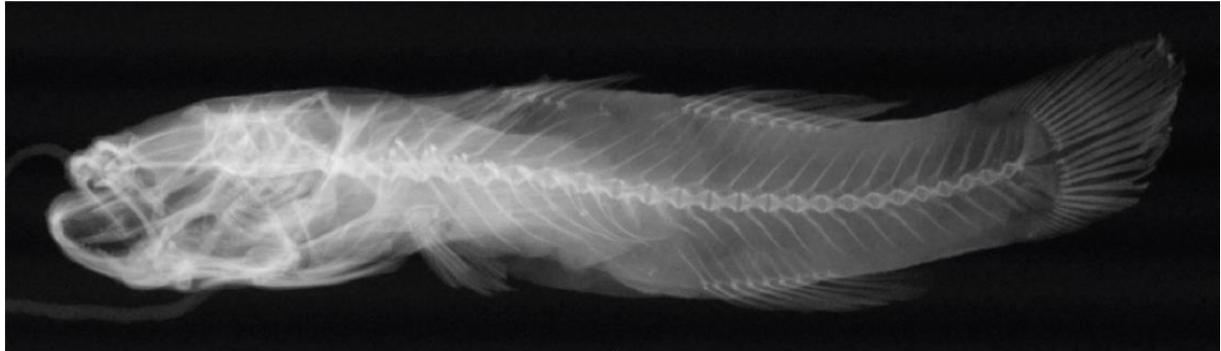


Annexe 1 : Comptage des vertèbres d'*Eleotris* à partir de radios prises aux Rayons X

Eleotris soaresi - BMNH 1856.3.18.26-27 - **Syntype**

Nombre de vertèbres : 24

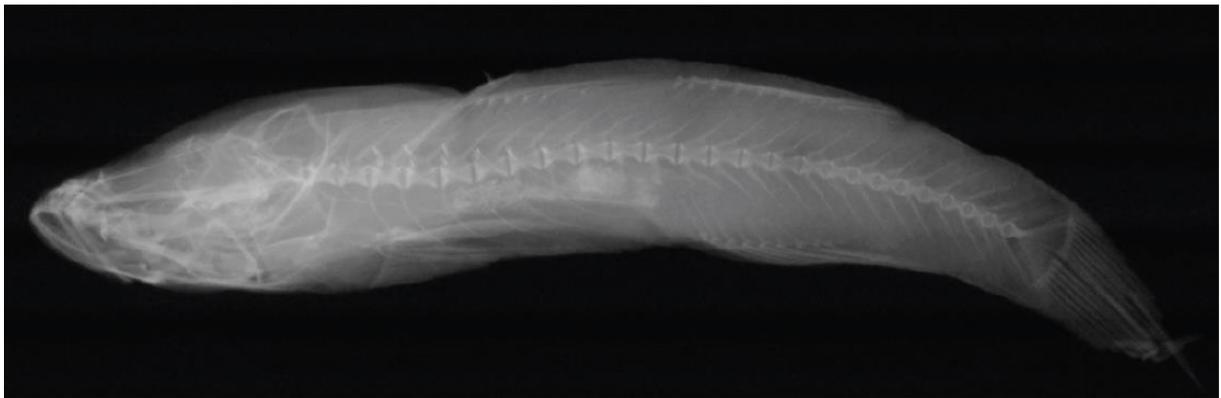
LS : 101,1 mm



Eleotris balia - USNM-52082 - **Holotype**

Nombre de vertèbres : 24

LS : 110,8 mm



Eleotris oxycephala - BMNH 2015.4.8.1 - **Possible syntype**

Nombre de vertèbres : 24

LS : 154,8 mm

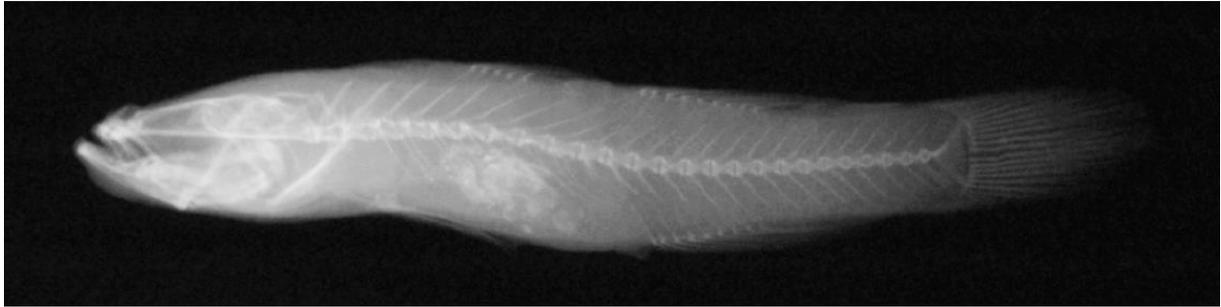


Annexe 1 : Comptage des vertèbres d'*Eleotris* à partir de radios prises aux Rayons X

Eleotris pseudoacanthopomus - SMNS 10595 - **Holotype**

Nombre de vertèbres : 24

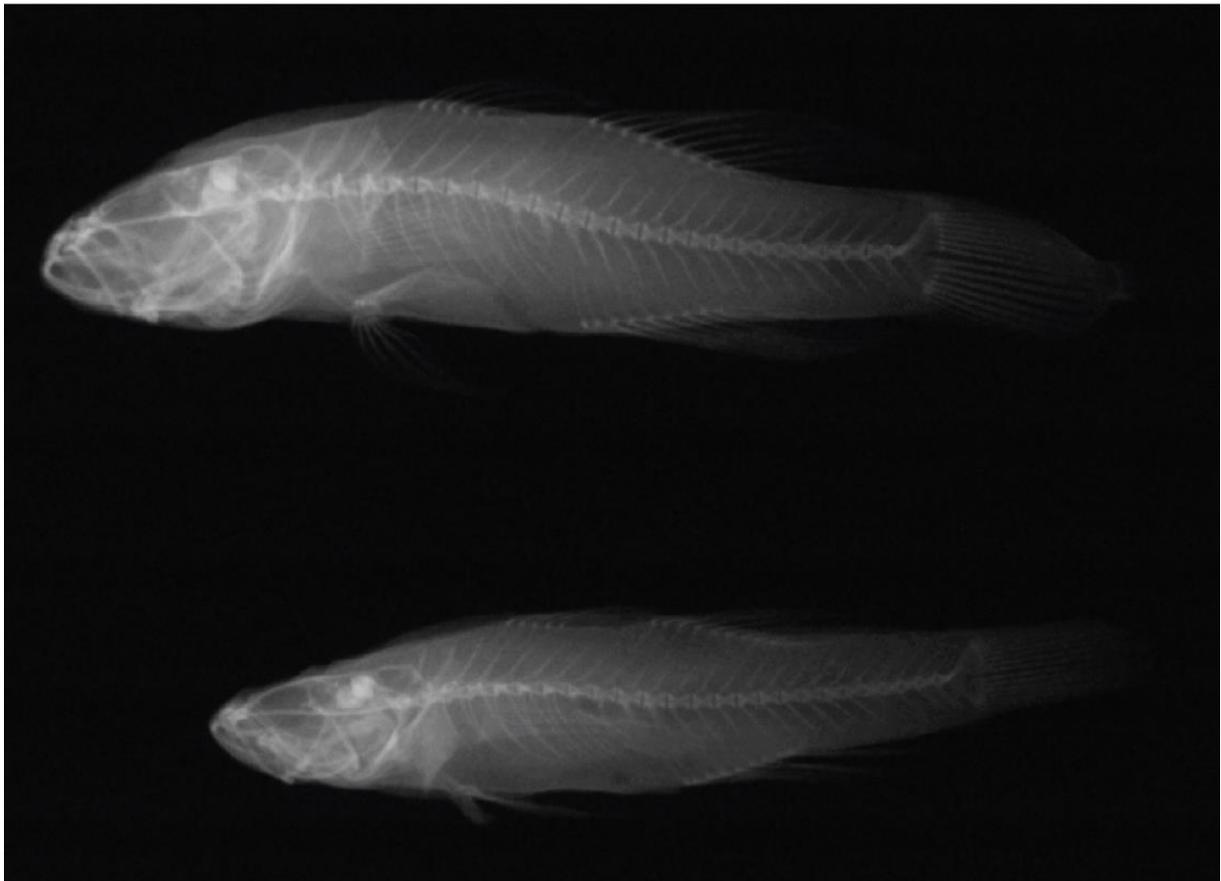
LS : 63,5 mm



Eleotris cf. pellegrini - MNHN 2007-0204 - Seychelles

Nombre de vertèbres : 23-24

LS : 51,5 et 58,1 mm

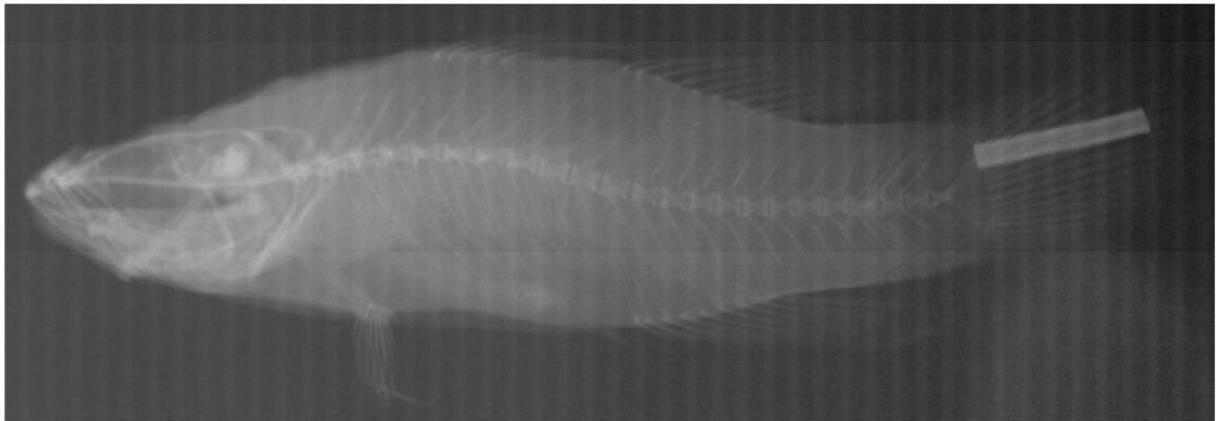


Annexe 1 : Comptage des vertèbres d'*Eleotris* à partir de radios prises aux Rayons X

Eleotris cf. pellegrini - 13970 - Seychelles

Nombre de vertèbres : 22

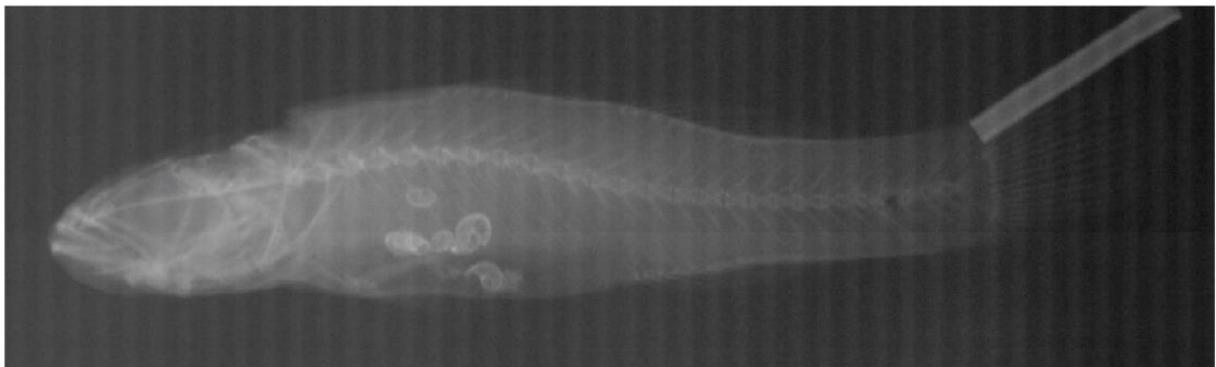
LS : 62,4 mm



Eleotris mauritiana - 11817 - Mayotte

Nombre de vertèbres : 24-25

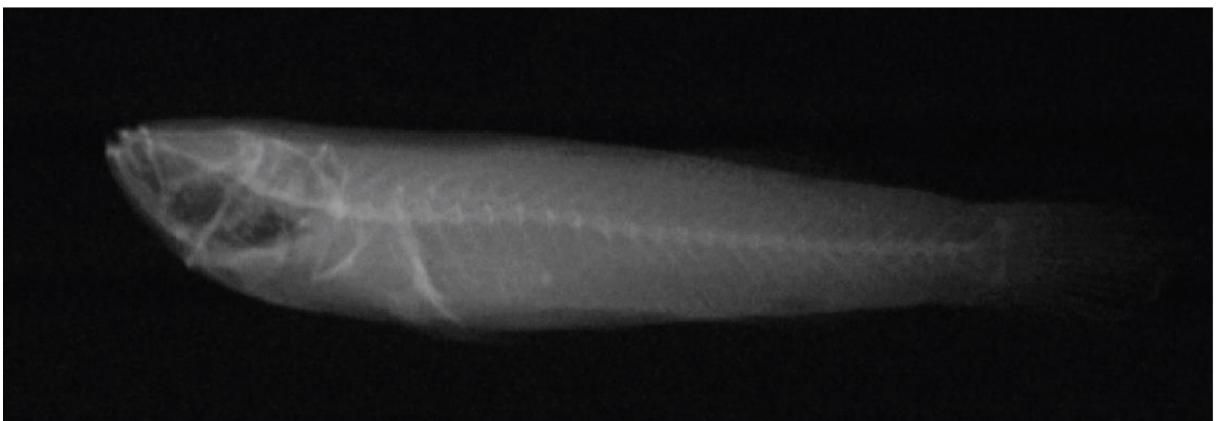
LS : 58 mm



Eleotris andamensis - CAS-SU 16968 - **Paratype**

Nombre de vertèbres : 25

LS : 38,1 mm



Annexe 1 : Comptage des vertèbres d'*Eleotris* à partir de radios prises aux Rayons X

Annexe 2 : Articles publiés

Amphidromous life cycle of *Eleotris fusca* (Gobioidei: Eleotridae), a widespread species from the Indo-Pacific studied by otolith analyses

by

Marion Isabelle MENNESSON* (1), Hélène TABOURET (1, 2), Christophe PÉCHEYRAN (2),
Eric FEUNTEUN (1) & Philippe KEITH (1)



© SFI
Received: 16 Jul. 2015
Accepted: 17 Sep. 2015
Editor: R. Causse

Abstract. – *Eleotris fusca* is a widespread amphidromous fish found in the Indo-Pacific area. Its life cycle is characterised by a marine pelagic larval phase allowing the species to disperse in the ocean and then to recruit to remote island rivers. In order to examine its migratory history and pelagic larval duration (PLD), otolith microchemical and microstructural analyses were undertaken on 100 specimens collected in the rivers of four areas: Mayotte, Reunion Island (Indian Ocean), Vanuatu and French Polynesia (Pacific Ocean). Variations of Sr:Ca ratios were observed along the otoliths using a femtosecond laser ablation-inductively coupled plasma spectrometer (fs-LA-ICP-MS). The variation of the Sr:Ca ratio allowed us to reconstruct fish migratory movements between sea water (high Sr:Ca) and freshwater (low Sr:Ca), and led us to assume that *Eleotris fusca* is an amphidromous species. Using microstructural analysis, we observed that the PLD depended on the sampling site. In the Pacific Ocean, the PLD is similar in Vanuatu (mean \pm SD: 90 ± 19.2 days) and French Polynesia (96.2 ± 17.5 days) whereas a significant difference emerged in the Indian Ocean between Mayotte (63.3 ± 11 days) and Reunion Island (114.8 ± 21.8 days).

Résumé. – Étude de l'histoire migratoire et de la durée de la phase larvaire d'*Eleotris fusca* (Gobioidei: Eleotridae), une espèce à large répartition dans l'Indo-Pacifique, à travers l'analyse des otolithes.

Key words

Eleotridae
Eleotris fusca
Indo-Pacific
Amphidromy
Pelagic larval duration
Otolith analysis

Eleotris fusca est une espèce de poisson amphidrome colonisant les milieux insulaires de l'Indo-Pacifique. Son cycle de vie est caractérisé par une phase larvaire marine lui permettant de disperser dans l'océan et ensuite de recruter dans les rivières d'îles plus éloignées. Dans le but de comprendre l'histoire migratoire ainsi que la durée de la phase larvaire (DPL), des analyses microchimiques et microstructurales des otolithes ont été réalisées sur 100 spécimens collectés dans les rivières de quatre zones : Mayotte, La Réunion (océan Indien), Vanuatu et Polynésie française (océan Pacifique). Les variations des ratios de Sr:Ca ont été observées le long des otolithes en utilisant un couplage ablation laser femtosecondes-spectromètre de masse à plasma induit (fs-LA-ICP-MS). La variation du ratio Sr:Ca nous a permis de reconstruire les mouvements migratoires des poissons entre l'eau de mer (Sr:Ca élevé) et l'eau douce (Sr:Ca faible), et de valider le cycle amphidrome d'*Eleotris fusca*. Avec l'analyse microstructurale, nous avons observé que les DPL dépendaient du site d'échantillonnage. Dans l'océan Pacifique, la DPL est similaire entre le Vanuatu (moyenne \pm écart type: $90 \pm 19,2$ jours) et la Polynésie française ($96,2 \pm 17,5$ jours) alors que pour l'océan Indien, nous observons une différence significative entre Mayotte ($63,3 \pm 11$ jours) et La Réunion ($114,8 \pm 21,8$ jours).

Insular river systems of the Indo-Pacific area are mostly inhabited by amphidromous species (teleost fish, crustaceans and molluscs). These species are the biggest contributors to the diversity of freshwater communities (Nelson *et al.*, 1997; Keith *et al.*, 2007; Watson *et al.*, 2007; Keith and Lord, 2011). Two fish families are predominant: Gobiidae and Eleotridae (Gobioidei). These gobioids spawn in freshwater. After hatching, free embryos drift downstream to the sea, where the pelagic larval phase takes place. After this marine pelagic phase, which extends nearly from three to nine months (Radtke *et al.*, 1988; Maeda *et al.*, 2007; Yamasaki *et al.*, 2007; Iida *et al.*, 2008; Lord *et al.*, 2010), individuals (post-larvae) return to rivers (recruitment phase) to

grow and reproduce. Such a life cycle is called amphidromous. Sometimes, the biomass of larvae migrating upstream is so great that they become a major source of food for local human populations in the Indo-Pacific and Caribbean areas (e.g. Reunion Island and Vanuatu) (Bell, 1999; Keith, 2003). This food resource is probably unsustainable considering the complexity of the gobioid life cycle and the lack of fisheries management.

Eleotris fusca (Bloch & Schneider, 1801) (Eleotridae) is a widespread species found in the Indo-Pacific area, from the Western Indian Ocean to New Caledonia, Vanuatu and French Polynesia (Keith *et al.*, 2006, 2010, 2013). In insular rivers, it is a common carnivorous species distributed

(1) Muséum national d'Histoire naturelle, Département des milieux et peuplements aquatiques, UMR BOREA MNHN – CNRS 7208 – IRD 207 – UPMC – UCBN, 57 rue Cuvier CP26, 75005 Paris, France. [helene.tabouret@univ-pau.fr] [feunteun@mnhn.fr] [keith@mnhn.fr]

(2) Laboratoire de chimie analytique bio-inorganique et environnement (LCABIE), UMR CNRS-UPPA 5254 IPREM, Hélioparc Pau Pyrénées, 64053 Pau, France. [christophe.pecheyran@univ-pau.fr]

* Corresponding author [mmenesson@edu.mnhn.fr]

primarily in freshwater (Maeda and Tachihara, 2004, 2006). This species is euryhaline and is found in brackish waters, but mainly in the lower part of freshwater areas. It prefers to be close to the riverbank where the current is slow, or in the lentic zones (Keith *et al.*, 2010).

The life history of some *Eleotris* (*E. melanosoma* Bleeker, 1853, *E. acanthopoma* Bleeker, 1853, as well as *E. fusca*) in Pacific area has been relatively studied with, for example, reproduction and early development (Maeda *et al.*, 2008), downstream migration (Maeda and Tachihara 2010; Yamasaki *et al.*, 2011), pelagic larval duration (Maeda *et al.*, 2007; Shiao *et al.*, 2015), recruitment (Maeda and Tachihara, 2005; Shiao *et al.*, 2015) and feeding habits (Resh *et al.*, 1999; Maeda and Tachihara, 2004). But generally, these studies were done at a local or regional scale.

In tropical islands, especially in Reunion Island, *E. fusca* undergoes pressures linked to the loss of the hydrological corridor and the habitat degradation. If the threats on this species were not clearly identify at the international scale due to a lack of investigations, the association of the habi-

tat loss and fisheries in the Reunion Island lead the IUCN France to classify *E. fusca* as “Endangered” on the red List of Endangered Species in France (IUCN France *et al.*, 2013). Because of its role in the freshwater ecosystem and the fishing of its post-larvae, it is important to understand the life cycle of this species to implement conservation measures.

Fish otoliths are calcified structures located in the inner ear of the fish. They usually show a series of growth structures formed on a daily basis called increments (Pannella, 1971). The otoliths are acellular, metabolically inert (Campana, 1999) and do not undergo any mineral resorption or alteration (Campana and Thorrold, 2001). Because of these characteristics, otoliths are used to reconstruct many details about the fish physiological and environmental past. Therefore, microstructures are used to accurately estimate fish age and to analyse and date specific events such as recruitment, metamorphosis or reproduction (Lecomte-Finiger, 1999; Radtke *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 1998). For amphidromous species, a check mark is formed at recruitment on the otolith when larvae enter the estuaries and start to colonise the riv-

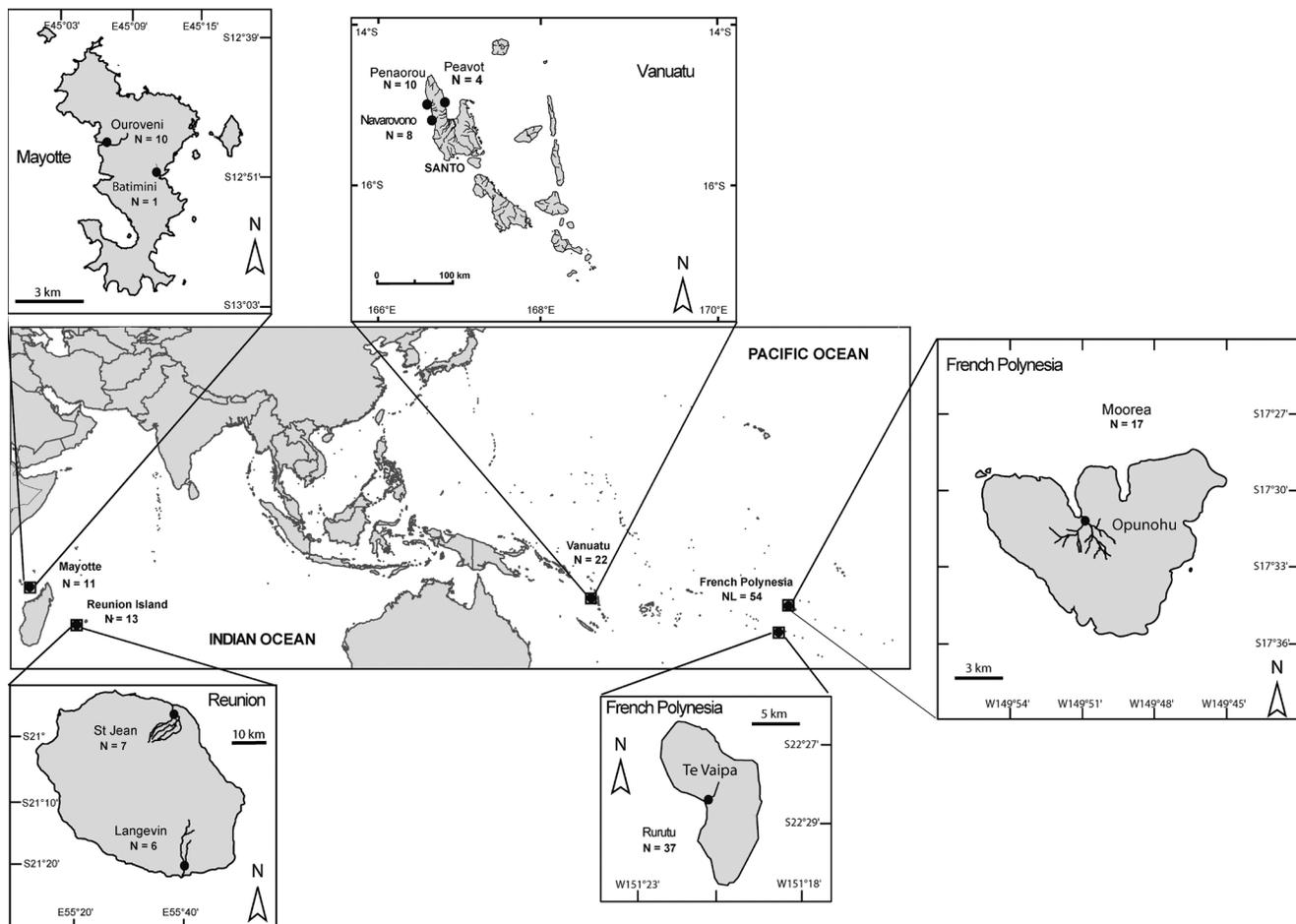


Figure 1. - Sampling locations of *Eleotris fusca* in the rivers (●) of four sites (■) in the Indo-Pacific: Mayotte (N = 11), Reunion Island (N = 13), Vanuatu (N = 22) and French Polynesia (N = 54).

ers (Shen *et al.*, 2002; Keith *et al.*, 2008). This mark allows to easily distinguish the marine larval phase from the juvenile and adult phases in freshwater. Daily increments from the core to the check mark are therefore an estimation of the pelagic larval duration (Yamasaki *et al.*, 2007; Taillebois *et al.*, 2012).

The otolith matrix is also able to trap minor and trace elements coming from the surrounding water and food. The otolith elemental composition is widely used for the reconstruction of the migratory and the environmental history of fish (Daverat *et al.*, 2005; Shiao *et al.*, 2006; Arai *et al.*, 2007; Lord *et al.*, 2011). Indeed, the strontium:calcium ratio (Sr:Ca) is used to reconstruct the migratory movements of diadromous fish between sea water and freshwater (Milton *et al.*, 2008; Tabouret *et al.*, 2010; Feutry *et al.*, 2011, 2012). For amphidromous species, elevated Sr:Ca ratios in fish otoliths are widely accepted as proof of occupation of marine habitats (Howland *et al.*, 2001; Crook *et al.*, 2006) or of a marine larval stage (Closs *et al.*, 2003), as opposed to low Sr:Ca ratio, which reflects occupation of freshwater habitats.

The aim of our study was to investigate, for the first time on a large scale, the life history traits and pelagic larval duration of the widespread species *Eleotris fusca* collected in four areas (Vanuatu and French Polynesia in Pacific Ocean and, Reunion Island and Mayotte in Indian Ocean) through the otolith microstructure and microchemistry. Firstly, we studied the elemental composition of the otolith to investigate the nature of the amphidromous life cycle of the species and secondly, we estimated the pelagic larval duration (PLD) and the larval growth, using the daily increments of the otoliths.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and measurement

One hundred specimens were collected in the rivers of four areas distributed in the Pacific Ocean (Vanuatu and French Polynesia) and the Indian Ocean (Mayotte and Reunion Island) (Fig. 1) using a DEKA 3000 electrofishing system (Gerätebau, Marsberg, Germany). Due to the threatened status of the species in the Indian Ocean (Endangered in Reunion Island, IUCN FRANCE *et al.*, 2013), fewer specimens have been collected in this area. All the fish were sampled in the lower part of the freshwater streams, as defined by Keith *et al.* (2013), at 5-50 m depth. Fish were put to sleep and killed using an overdose of clove essential oil (10%), then stored and preserved in 95% alcohol. The standard length (N = 62) was measured using a dial caliper (Mitutoyo) (Tab. I).

Table I. - Sampling locations in the four countries and number (N) of *Eleotris fusca* specimens used for the standard length (N_{SL}), the marine pelagic larval duration estimation (N_{PLD}) and for the microchemistry analysis. SL: Standard length; PLD: Pelagic larval duration; SD: Standard deviation.

Ocean	Location country/island	River	Date	N	N per site	SL in mm (mean ± SD)	N _{SL}	PLD for each country (days) (mean ± SD)	PLD for each ocean (days) (mean ± SD)	N _{PLD}	Otoliths used for microchemistry analysis
Pacific (N = 76)	Vanuatu-Santo	Navarovono	Nov. 2007	8		54.4 ± 7.6 range [31.4-69.1]	13	90 ± 19.2 range [57-130.5]	93 ± 18.4	20	11
	Vanuatu-Santo	Penaorou	Nov. 2006	10	22						
	Vanuatu-Santo	Peavot	Nov. 2006	4							
	French Polynesia-Moorea	Opunohu	Jun. 2007	17	54	61.6 ± 13.3 range [35.7-88.7]	25	96.2 ± 17.5 range [62-131.5]			
	French Polynesia-Rurutu	Te vaipa	Jul. 2007	37							
						Total N _{SL} = 38		Total N _{PLD} = 39		Total N = 26	
Indian (N = 24)	Mayotte	Batimimi	Nov. 2003	1		61.8 ± 17.4 range [42.7-82.4]	11	63.3 ± 11 range [38-78]	91.4 ± 31.5	10	4
	Mayotte	Ourovoti	Apr. 2009	3	11						
	Mayotte	Ourovoti	May 2006	7							
	Reunion	Saint Jean	Mar. 2007	7	13	64.5 ± 14.1 range [44.5-83.2]	13	114.8 ± 21.8 range [82.5-141]			
	Reunion	Langevin	Nov. 1998	6							
						Total N _{SL} = 24		Total N _{PLD} = 22		Total N = 9	

Otolith preparation and estimation of the PLD

Pairs of sagittal otoliths were extracted from fish under a binocular stereomicroscope (Olympus VZ), rinsed in distilled water and dried. Otoliths were individually embedded in epoxy resin (Araldite 2020, Escil, France). For each specimen, one of the otoliths was ground on a transverse section down to the core, using carbide silicon abrasive discs of decreasing grain size (Escil, France). The embed-

ded otolith was polished with alumina paste (Escil, France) and thoroughly rinsed in MilliQ water. Preparations were finally dried and kept in dry clean tubes. Otolith microstructure observations were made under an Olympus BX51 light microscope; each otolith was photographed with an Olympus DP20 digital camera.

According to previous studies that validated the daily accretion growth of fish, especially *Eleotris* (Maeda *et al.*,

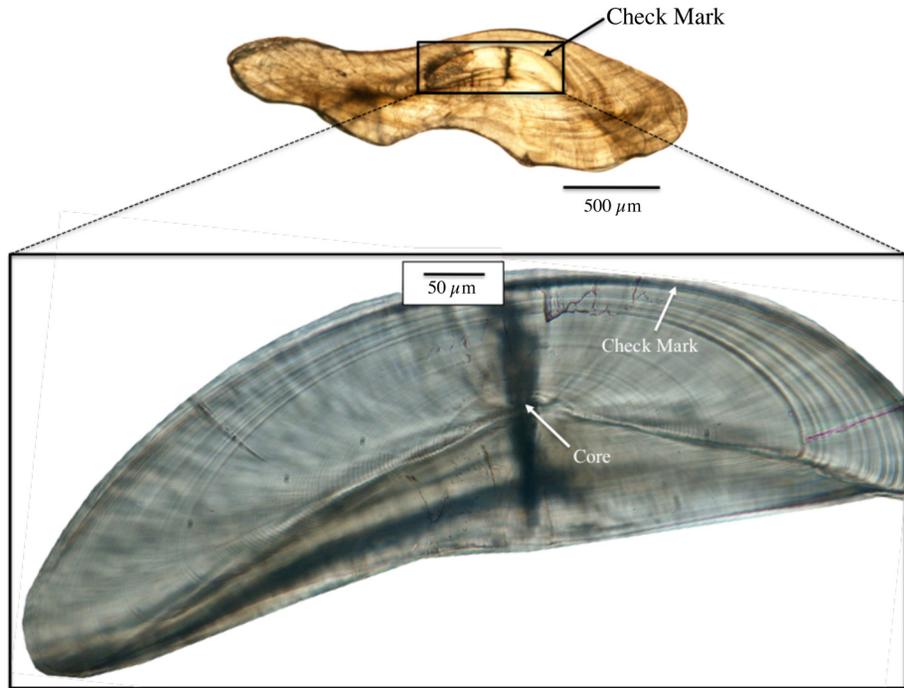


Figure 2. - Transverse section of sagittal otolith of an *Eleotris fusca* from French Polynesia. The detailed area is a magnification of the marine larval phase, *i.e.* the area included between the core and the check mark.

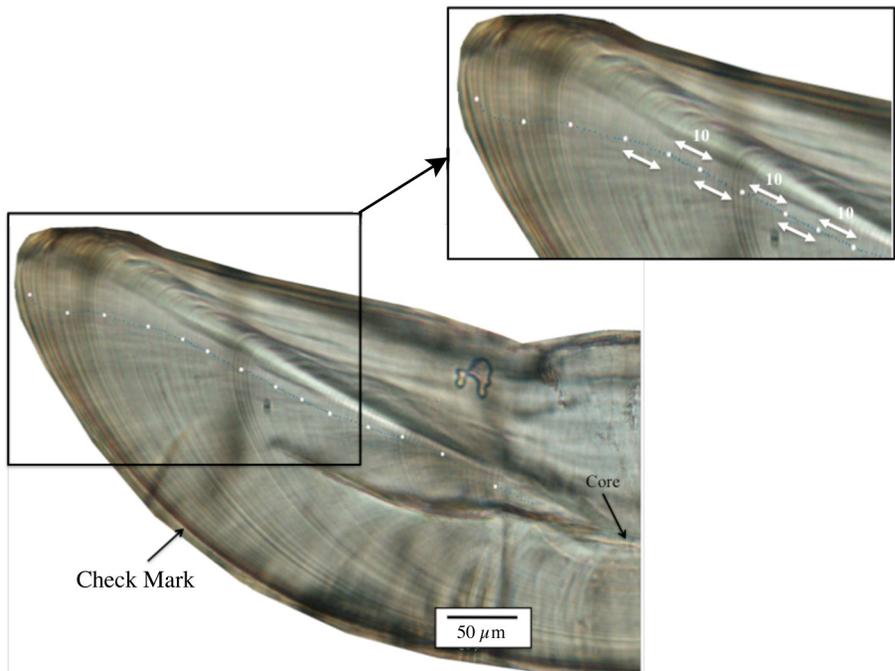


Figure 3. - Growth rate analysis of : *Eleotris fusca* otolith; white dots every 10 daily increments.

2007), or amphidromous gobies (Yamasaki *et al.*, 2007; Iida *et al.*, 2010a; Taillebois *et al.*, 2012), we assumed that the otolith increments of *E. fusca* were formed on a daily basis. The first increment after the core is assumed to occur at hatching (Lecomte-Finiger, 1999). To estimate the PLD, the daily increments were counted from the core to the check mark (Fig. 2). For each otolith, two readers independently counted the number of increments.

Pannela (1971) showed that the growth of the otolith reflects the metabolism of the fish and, therefore, its growth. So, we assumed that the otolith growth rate from the core to the check mark represents the larval growth of the individual. The mean growth rate of the otolith ($\mu\text{m}/\text{day}$) during the marine larval phase was calculated using AnalySIS work 5.0 software (Olympus, Germany) by measuring the distance (μm) every 10 daily increments from the core to the check mark along the longest radius (Fig. 3).

Microchemical analysis

Eleven otoliths from Vanuatu, fifteen otoliths from French Polynesia, five from Reunion Island and four from Mayotte were analyzed with an IR 10130 nm femtosecond laser (Alfamet-Novalase, France) coupled to an Elan DRC II (Perkin Elmer) inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICPMS). A linear raster scan ablation 20 μm width was made along the longest radius of the otolith. The ablation started 70 μm before the core and ended at the otolith edge passing through the core and the check mark. The laser beam was applied with a 500 Hz frequency at a speed of 5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Ablation conditions were described in previous studies on Gobiidae species (Lord *et al.*, 2011; Tabouret *et al.*, 2011). ^{43}Ca was used as an internal standard for each ablation to check for variation in ablation yield. Quantification of ^{86}Sr concentration was allowed using three certified reference glasses: NIST614, NIST612 and NIST610 (National Institute of Standards and Technology, USA). Analytical accuracy was achieved with the fish certified otolith reference material NIES22 (National Institute for Environmental Studies, Japan). Strontium was standardized to calcium (*i.e.* Sr:Ca) based on the stoichiometry of calcium carbonate (380,000 $\mu\text{g Ca g}^{-1}$ otolith), as this element can substitute for calcium in the otolith matrix (Campana, 1999). The average detection limit based on three standard deviations (SD) of the blank gas was 3.28 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ for ^{86}Sr *i.e.* 0.86×10^{-5} .

Statistical analysis

The data was statistically processed using the free R software (version 3.0; R Development Core Team, 2014). First, the normality of the data was systematically verified using Shapiro-Wilks normality test, allowing us to choose between parametric and non-parametric tests. In order to test whether larval and pelagic phase were different, the Sr:Ca values for each island were compared between the pelagic larval phase

and the freshwater phase using a Kruskal-Wallis test and, for each individual, using a pair-sample Wilcoxon or Student test. In order to test the PLD estimated by the two readers, a paired-t test was performed. A one-way ANOVA was used to compare PLDs among the four sampling PLD. With a Student test, we compared PLD between the two oceans, and within each ocean: Indian (Mayotte-Reunion Island) and Pacific (Vanuatu-French Polynesia). The relationship between the standard length and the longest radius of otoliths was tested with a Spearman test. Then, the total growth rate of the otolith in the four areas was tested with a Kruskal-Wallis test. For each test the Bonferonni correlation was applied to avoid any error due to the repetition of analyses.

RESULTS

Considering the reading difficulty of some otoliths, not all otoliths were used for the analyses. Sixty-one were used for the PLD and 35 for the microchemistry (Tab. I).

Otolith Sr:Ca ratios

For all individuals of *Eleotris fusca* used for microchemical analyses (N = 35), the Sr:Ca ratios show the same pattern ($p > 0.4$ for each site). The Sr:Ca ratio is high and constant during the marine pelagic larval phase, *i.e.* from the core to the check mark, with mean values of (mean \pm SD) $8.55 \pm 0.59 \times 10^{-3}$, $8.75 \pm 0.78 \times 10^{-3}$, $8.89 \pm 0.83 \times 10^{-3}$, $9.57 \pm 0.62 \times 10^{-3}$ for Vanuatu (individual V1 to V11), French Polynesia (individual FP1 to FP15), Reunion Island (individual R1 to R5) and Mayotte (individual M1 to M4) specimens, respectively (Fig. 4). Then, it decreases drastically at the check mark and reaches a lower ratio of $2.94 \pm 1.34 \times 10^{-3}$ for the individuals from Vanuatu, $3.38 \pm 0.55 \times 10^{-3}$ for those from French Polynesia (N = 26, $p < 0.001$) and, to $3.37 \pm 0.12 \times 10^{-3}$ for samples from Reunion Island and $4 \pm 0.34 \times 10^{-3}$ for Mayotte (N = 9, $p < 0.001$).

PLD Estimation

Since there was no significant difference in the age at recruitment between the two independent readers ($t = -1.5607$, $p = 0.1249$), we used the mean of the two readings to have the best PLD estimation.

PLDs in the four areas were analysed by a one-way ANOVA and it revealed that at least one locality among the four showed a significantly different PLD ($p < 0.001$). Moreover, a Student test indicated that mean PLDs are similar between Pacific (mean \pm SD: 93.0 ± 18.4 days) and Indian oceans (91.4 ± 31.5 days) ($t = -0.2171$, $p = 0.8296$). The same result was obtained when we compared Vanuatu (90.0 ± 19.2 days [range of: 57-130.5 days]) and French Polynesia (96.2 ± 17.5 days [62-131.5 days]) ($t = -1.0551$, $p = 0.2982$). However, there is a significant difference between Mayo-

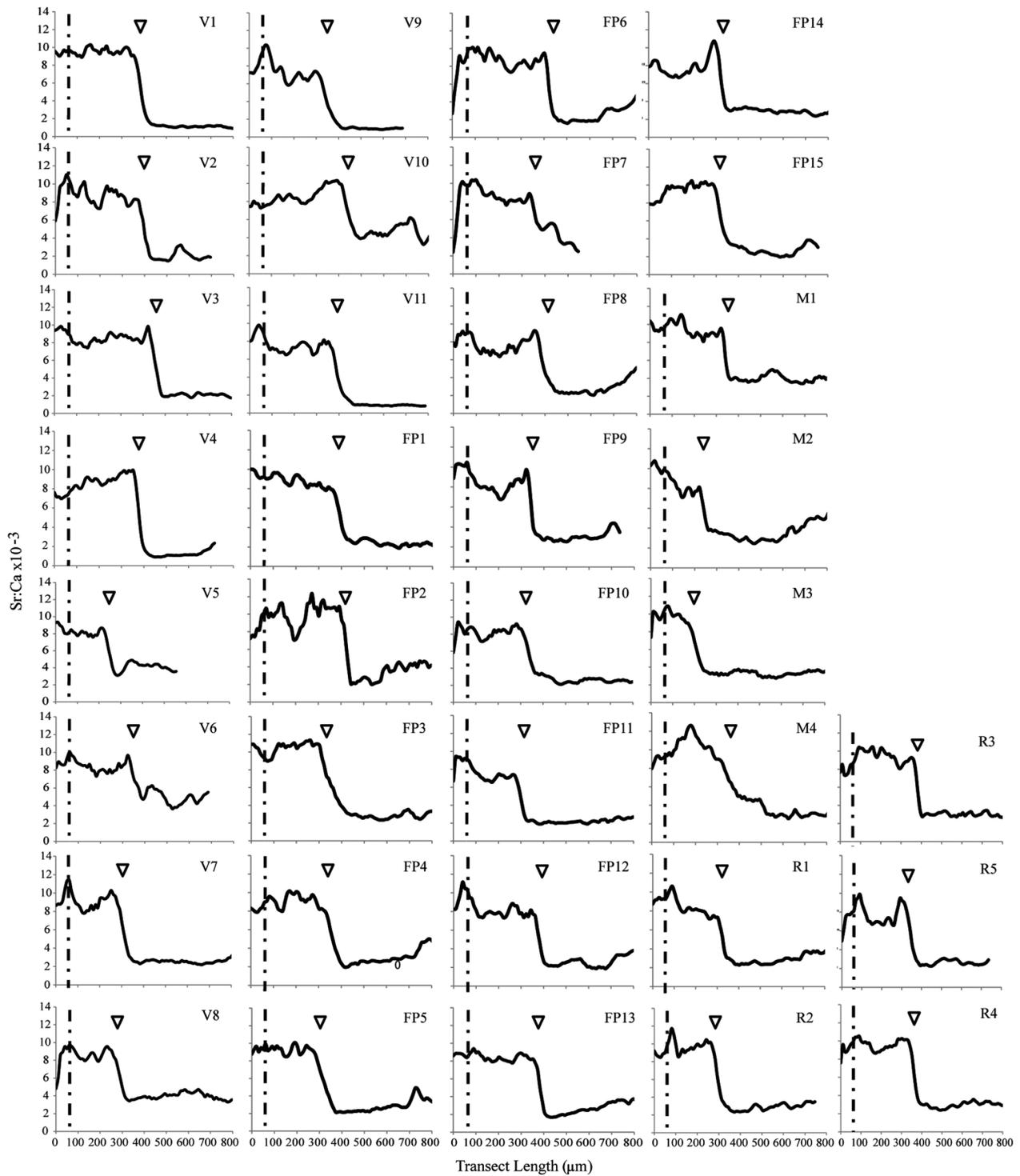


Figure 4. - Sr:Ca profiles (black line) provided by fs-LA-ICP-MS on otoliths of *Eleotris fusca* from Vanuatu (V1 to V11), French Polynesia (FP1 to FP15), Mayotte (M1 to M4) and Reunion Island (R1 to R5). Dotted line: core; White triangle: check mark.

tte (63.4 ± 5.8 days [38-78 days]) and Reunion Island (114.8 ± 21.8 days [82.5-141 days]) specimens in the Indian Ocean ($t = -6.7752, p < 0.001$).

In other terms, the pelagic larval duration depends on the sampling site. The Pacific Ocean PLD appears homogenous whereas significant differences emerge in the Indian Ocean

between Mayotte and Reunion Island (Tab. I).

Otolith growth

According to the Spearman test, there is a significant relationship between the standard length and the longest radius of otoliths ($N = 62, S = 8360, p < 0.0001; r^2 = 0.69$).

For all site, the same pattern occurs (Fig. 5): the otolith growth rate is high during the first 10 days of the larval

life (mean \pm SD: $6.79 \pm 1.57 \mu\text{m/day}$ for Vanuatu; $6.43 \pm 2.11 \mu\text{m/day}$ for French Polynesia, $8.25 \pm 5.17 \mu\text{m/day}$ for Mayotte and $6.51 \pm 1.79 \mu\text{m/day}$ for Reunion Island), then it decreases drastically ($4.26 \pm 0.72 \mu\text{m/day}$ for Vanuatu; $3.38 \pm 1.26 \mu\text{m/day}$ for French Polynesia, $4.97 \pm 2.13 \mu\text{m/day}$ for Mayotte and $2.91 \pm 0.6 \mu\text{m/day}$ for Reunion Island) between the 10th and the 20th day, and more gradually from the 20th day to the recruitment mark (around $2.7 \mu\text{m/day}$). A Kruskal-

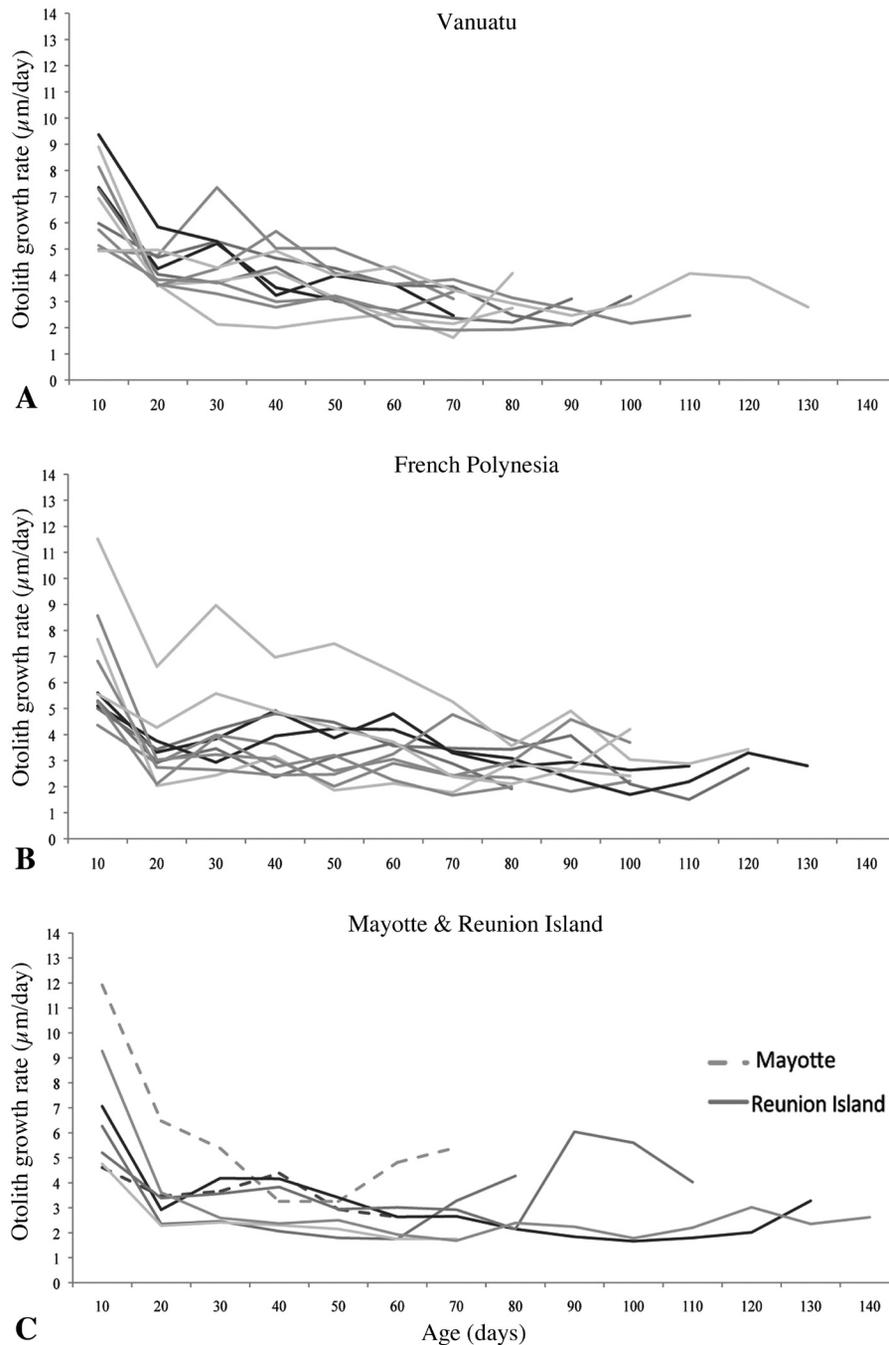


Figure 5. - Otolith growth rate from the core to the check mark as a function of age for the Vanuatu (A), French Polynesia (B), and Mayotte and Reunion Island (C) samples. The age 0 is assumed to correspond to hatching (core) and the older age to the recruitment check mark.

Wallis test showed that the total growth rate from the core to the check mark of the otolith changes with a similar pattern in the four areas ($N = 37$, $\chi^2 = 12$, $p = 0.4457$).

DISCUSSION

Otolith Sr:Ca

Whatever the island considered, microchemical analysis of *Eleotris fusca* otoliths revealed high Sr:Ca ratios from the core (hatching) to the check mark and low values after the check mark to the edge of the otolith.

We know that individuals were caught in freshwater, so we used the Sr:Ca values at the otolith edge as a reference to characterise the Sr:Ca in freshwater *i.e.*, values under 2×10^{-3} . Sr:Ca ratios from the check mark to the core of the otolith are higher than those of the edges ($8.55 \pm 0.59 \times 10^{-3}$ to $9.57 \pm 0.62 \times 10^{-3}$), suggesting that these values indicate an area with high salinity (estuary and ocean). Such elevated ratios in fish otoliths are widely accepted as a marine fingerprint (Tzeng, 1996; Tsunagawa and Arai, 2009; Tabouret *et al.*, 2010) and the decrease of Sr:Ca ratio ($2.94 \pm 1.34 \times 10^{-3}$ to $4 \pm 0.34 \times 10^{-3}$) always coincides with the check mark *i.e.* when individuals enter rivers. This pattern and the values observed were usually found for other amphidromous species like *Sicyopterus lagocephalus* (Pallas, 1770) (high Sr:Ca values: $10\text{--}12 \times 10^{-3}$ and low values: $2\text{--}4 \times 10^{-3}$) (Lord *et al.*, 2011), *Sicydium punctatum* Perugia, 1896 ($9.39 \pm 0.50 \times 10^{-3}$ and $2\text{--}4 \times 10^{-3}$) (Tabouret *et al.*, 2011) or other Gobiidae (Radtke and Kinzie, 1996; Chang *et al.*, 2006; Taillebois *et al.*, 2015). *E. fusca* is generally known as amphidromous (Keith *et al.*, 2010, 2013). Maeda and Tachihara (2004, 2005) have demonstrated the amphidromy of this species in Japan. On the other hand, it was considered as an estuarine species by several authors (e.g., Kuo and Shao 1999; Vivier *et al.*, 2010). However, the results of our study on otolith microchemistry support the amphidromy of *E. fusca* on all sites studied.

After the check mark, *i.e.* during freshwater life, the Sr:Ca ratio is relatively stable, except for some profiles such as Vanuatu individual V2, French Polynesian individual FP2 or Mayotte individual M2 (Fig. 4), where we observed a slight increase. Some physiological processes are known to leave a chemical mark on the otolith, such as stressful events and reproductive activity, both in the form of elevated Sr:Ca ratios (Campana, 1999). The ability of some individuals to move from freshwater habitats to brackish, or in some parts of the river, could explain the slight fluctuation of Sr:Ca observed (Lord *et al.*, 2011). Indeed, Maeda and Tachihara (2004) showed that in the Teima River (Okinawa, Japan) *E. fusca* is distributed from the upper limit under tidal influence area to freshwater area. This distribution might explain why certain profiles present some Sr:Ca variations. Moreover,

elemental concentration in tropical rivers or estuaries can be modified by extreme climatic and hydrological seasonal variations or by sediment loads or river flows (Tabouret *et al.*, 2011). But attributing a particular event to a peak or a particular variation of the ratios is difficult without a good knowledge of the event (e.g., Fig. 4. V2).

Duration of the pelagic larval phase (PLD)

Some studies have been conducted on the PLDs of Eleotridae and found similar results. Sirot (2009) found PLD around 75 ± 17.24 days ($N = 36$) for *Eleotris perniger* (Cope, 1871), a species in Guadeloupe (French West Indies). In Dominica, the age at recruitment of *E. pisonis* (Gmelin, 1789) ($N = 21$) was about 80 to 160 days (Bell *et al.*, 1995). Maeda *et al.* (2007) found for *E. fusca*, *E. melanosoma* and *E. acanthopoma* PLDs around two to four months in Okinawa Island, Japan. Moreover, Shiao *et al.* (2015) obtained a PLD of about 84–111 days ($N = 12$) for *E. fusca* in Taiwan and Corbarieu (2008) found 150 ± 17.24 days ($N = 82$) in Reunion Island. But all these studies focused on a small geographical scale (one island).

In this present study, we focused on a larger scale (four islands in two oceans). We showed that, depending on the area, the pelagic larval duration of *E. fusca* individuals is not the same and is highly variable. Significant differences were found in the Indian Ocean; PLD varied by means of two between the studied islands, Mayotte (63.4 ± 5.8 days; [38–78 days]) and Reunion Island (114.8 ± 21.8 days; [82.5–141 days]), although ranges of standard length are similar. On the contrary, both PLD and standard length ranges are similar for Vanuatu (90 ± 19.2 days; [57–130.5 days]) and French Polynesia (96.2 ± 17.5 days; [62–131.5 days]) in the Pacific Ocean (Tab. I).

Some studies showed that PLD could vary with the season (McDowall *et al.*, 1994; Bell *et al.*, 1995; Radtke *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2007; Teichert *et al.*, 2014). These studies revealed that short PLDs and high growth rates were generally observed during the warmer season. This phenomenon may explain the PLD difference in the Indian Ocean. Indeed, in Reunion Island, Corbarieu (2008) showed that there is a significant difference in the age at recruitment for *E. fusca* (*i.e.* in PLDs). When the individuals were born in summer (hot [$25\text{--}27^\circ\text{C}$, mean: 26°C] and humid season), between November and April, the PLDs were shorter (110 ± 14 days; [76–128 days]; $N = 30$) than those born in winter (cool [$24\text{--}27^\circ\text{C}$, mean: 25°C] and dry season), between May and October (193 ± 22 days; [152–228 days]; $N = 23$). On the same island, Teichert *et al.* (2014) showed similar results for *Sicyopterus lagocephalus*: PLDs and size are related to the hatching date, showing that the seasonal effect was the main component of variability for these two parameters. Indeed, the youngest and smallest post-larvae (short PLDs) hatched from November and January (summer) and recruited from

March and May, whereas the oldest and largest (high PLDs) hatched between June and August (winter) and recruited in January-March. There is the same seasonality in Mayotte but the sea surface temperatures (SST), recorded around Mayotte from the NOAA's Coral Reef Watch Program's satellite (<http://coralreefwatch.noaa.gov/satellite/index.php>) for the two seasons, are higher than around Reunion Island (i.e. 27-29°C in summer, mean: 28°C and 26-29°C in winter, mean: 27°C); this could explain why the PLDs are shorter in Mayotte, whatever the season, compared to Reunion Island.

The pluviometry, which varied according to the season, can also effect the pelagic larval duration. Indeed, the heavy rain in summer seems to be associated with two important life stages: the drift to the sea of the newly hatched larvae and the recruitment of marine post-larvae in freshwater. The increase of freshwater flows in the season may help newly hatched larvae to drift downstream to sea sooner, and these flows seem to trigger the post-larvae migration inland (Keith, 2003).

The seasons seem to have a major impact on the PLD with the difference of SST and the variability of the freshwater flow. But according to Grant and Bowen (1998), the larval dispersal could be subject to numerous physical barriers such as the depth, the salinity, the gyres and the current patterns (Borkin, 1991; Hare and Cowen, 1996; Murphy and Cowan, 2007). And larvae could also actively swim in the sea as described in gobiids (Balon and Bruton, 1994; Leis and McCormick, 2002; Iida *et al.*, 2010b). All of these may have an impact on the PLD.

The distance and the difficulty to reach some islands may lead to longer PLDs and increase the probability of a suitable stream for recruitment (Radtke and Kinzie, 1996; Keith, 2003). In the widespread amphidromous species *S. lagocephalus*, as it is the case for *E. fusca*, PLDs in Pacific islands are shorter (130 ± 3.4 days; Lord *et al.*, 2010) than those of Reunion Island (201 ± 40 days, Hoareau, 2005; 170.4 ± 43.7 days, Teichert, 2014). Thus, it seems that Reunion Island is submitted to special current conditions. Indeed, the island appears to be isolated by the anticyclonic subtropical gyre in the South-Western Indian Ocean (Wyrтки, 1973). Larvae emitted from Reunion Island or from Maurice Island may stay in the sea for a longer period of time, which would explain increased PLDs. Moreover, the percentage of auto- and allo-recruitment is unknown but we know that there is gene flow between Indian islands (Mennesson, unpubl. data).

Nevertheless, more studies are needed to explain these results. A phylogeographic study on the populations of *E. fusca* would bring insights into the dispersal of the species.

Otolith growth

For all the samples, during growth, pattern is observed for all fish during the larval phase. Indeed, no significant difference in the otolith growth rate ($\mu\text{m}/\text{day}$) was detected between the four sites and between both oceans (Fig. 5). The otolith growth reflects the fish growth and evolves according to three phases. During the first phase (first 10 days), the growth is rapid (e.g. Vanuatu individuals: $6.79 \pm 1.57 \mu\text{m}/\text{day}$); then in the second phase, it drops 10 days after ($4.26 \pm 0.72 \mu\text{m}/\text{day}$) and decreases gradually (3.93 to $2.5 \mu\text{m}/\text{day}$) in the third phase (from the 30th day), until it reaches a plateau. These phases might be related to the morphological and physiological modifications of larvae during the marine phase (Valade, 2001; Keith *et al.*, 2008). However, the timing of the first deposition is not yet known for *Eleotris fusca* and it may also have several days lag. But it is generally known for a lot of fish species that the first increment is deposited during their first feeding when the larva has completed yolk absorption (Brothers *et al.*, 1976; Laroche *et al.*, 1982; Tzeng and Yu, 1988) but it needs to be studied for *E. fusca*. Maeda *et al.* (2008) studied the reproductive biology and the early development of *E. fusca*. This study showed that embryos spend more than 24 hours in their egg and that the yolk sac decreases the first day after hatching and disappears the fourth day under rearing condition. The mouth and the pectoral fins begin to form the second day. On the third day the mouth is opened. Thus, the mouth is functional before the yolk sac is completely absorbed. In the sea, larvae are supposed to be planktonic and feeding on zooplankton, which is less energetic than the yolk sac; that could induce a decrease of growth rate after the first 10 days (Lord *et al.*, 2010; Teichert *et al.*, 2014).

It is important to specify that there is an individual variability in the otolith growth rate in amphidromous fish (Lord *et al.*, 2010; this study). Some aspects and events might affect it, such as genetic or environmental variability like the food resources (Jones, 1986; Cushing, 1990) or water temperatures (McCormick and Molony, 1995; Shafer, 2000; Radtke *et al.*, 2001), depending themselves on the seasons.

CONCLUSION

This study shows that *Eleotris fusca* is an amphidromous species with a high variability in the PLD according to the sampling localities. This variability illustrates the fact that *E. fusca* has a high plasticity in its pelagic larval duration and thus reveals an important adaptation capacity, according to the environmental conditions encountered. Nevertheless, amphidromous species are distributed along the river from the estuary to higher reaches according to their ecology. And it is important to allow species to move freely (no barriers) between downstream and upstream in the river and between

the river and the sea. The success of such a life cycle depends highly on the management and the conservation of their habitats.

Acknowledgements. – We would like to thank the Muséum national d'Histoire naturelle, Paris (DMPA and UMR BOREA), the Vanuatu Environment Unit (D. Kalfatak) and ARDA (Association Réunionnaise pour le Développement de l'Aquaculture). This study was possible with the assistance of the following colleagues: G. Marquet, P. Feutry, T. Robinet, P. Sasal, R. Galzin, M. Hauteceur and C. Lord.

REFERENCES

- ARAI T., HIRATA T. & TAKAGI Y., 2007. - Application of laser ablation ICPMS to trace the environmental history of chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Mar. Environ. Res.*, 63: 55-66.
- BALON E.K. & BRUTON M.N., 1994. - Fishes of the Tatinga River, Comoros with comments on freshwater amphidromy in the goby *Sicyopterus lagocephalus*. *Ichthyol. Explor. Freshw.*, 5: 25-40.
- BELL K.N.I., 1999. - An overview of goby-fry fisheries. *Naga, ICLARM Quart.*, 22(4): 30-36.
- BELL K.N.I., BROWN J.A. & PEPIN P., 1995. - Seasonal, inverse cycling of length- and age-at-recruitment in the diadromous gobies *Sicydium punctatum* and *Sicydium antillarum* in Dominica, West Indies. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 52: 1535-1545.
- BORKIN I.V., 1991. - Ichthyoplankton of western Spitzbergen coastal waters. *J. Ichthyol.*, 31: 680-685.
- BROTHERS E.B., MATHEWS C.P. & LASKER R., 1976. - Daily growth increments in otoliths from larval and adult fishes. *Fish Bull.*, 74: 1-8.
- CAMPANA S.E., 1999. - Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 188: 263-297.
- CAMPANA S.E. & THORROLD S.R., 2001. - Otoliths, increments, and elements: key to a comprehensive understanding of fish populations? *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 58: 30-38.
- CHANG M.Y., WANG C.H., YOU C.F. & TZENG W.N., 2006. - Individual-based dispersal patterns of larval gobies in an estuary as indicated by otolith elemental fingerprints. *Sci. Mar.*, 70S2: 165-174.
- CLOSS G.P., SMITH M., BARRY B. & MARKWITZ A., 2003. - Non diadromous recruitment in coastal population of common bully (*Gobiomorphus cotidianus*). *N.Z.J. Mar. Freshw. Res.*, 37: 301-313.
- CORBARIEU A., 2008. - Caractérisation de la vie larvaire et des premiers stades de développement en eau douce chez *Awaous commersoni*, *Eleotris fusca* et *Eleotris mauritiana*, poissons amphidromes de La Réunion. Master degree dissertation, Polytechnique Montpellier, France.
- CROOK D.A., MACDONALD J.I., O'CONNOR J.P. & BARRY B., 2006. - Use of otolith chemistry to examine patterns of diadromy in the threatened Australian grayling *Prototroctes maraena*. *J. Fish Biol.*, 69: 1330-1344.
- CUSHING D.H., 1990. - Plankton production and year-class strength in fish populations: an update of the match/mismatch hypothesis. *Adv. Mar. Biol.*, 26: 249-293.
- DAVERAT F., TOMAS J., LAHAYE M., PLAMER M. & ELIE P., 2005. - Tracking continental habitat shifts of eels using otolith Sr/Ca ratios: validation and application to the coastal, estuarine and riverine eels of the Gironde-Garonne-Dordogne watershed. *Mar. Freshw. Res.*, 56: 619-627.
- FEUTRY P., KEITH P., PÉCHEYRAN C., CLAVERIE F. & ROBINET T., 2011. - Evidence of diadromy in the French Polynesian *Kuhlia malo* (Teleostei: Percoidei) inferred from otolith microchemistry analysis. *Ecol. Freshw. Fish*, 20: 636-645.
- FEUTRY P., TABOURET H., MAEDA K., PÉCHEYRAN C. & KEITH P., 2012. - Diadromous life cycle and behavioral plasticity in freshwater and estuarine Kuhlidae species (Teleostei) revealed by otolith microchemistry. *Aquat. Biol.*, 15: 195-204.
- GRANT W.S. & BOWEN B.W., 1998. - Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.*, 89: 415-426.
- HARE J.A. & COWEN R.K., 1996. - Transport mechanisms of larval and pelagic juvenile bluefish (*Pomatomus saltarix*) from South Atlantic Bight spawning grounds to Middle Atlantic Bight nursery habitats. *Limnol. Oceanogr.*, 41: 1264-1280.
- HOAREAU T.B., 2005. - Dynamique structurale des populations de "bichiques" (*Sicyopterus lagocephalus*), Gobiidés amphidromes de rivières de La Réunion. PhD dissertation, Université de La Réunion.
- HOWLAND K.L., TONN W.M., BABALUK J.A. & TALLMAN R.F., 2001. - Identification of freshwater and anadromous inconnu in the Mackenzie River system by analysis of otolith strontium. *Trans. Am. Fish Soc.*, 130: 725-741.
- IIDA M., WATANABE S., SHINODA A. & TSUKAMOTO K., 2008. - Recruitment of the amphidromous goby *Sicyopterus japonicus* to the estuary of the Ota River, Wakayama, Japan. *Environ. Biol. Fish.*, 83: 331-341.
- IIDA M., WATANABE S. & TSUKAMOTO K., 2010a. - Validation of otolith daily increments in the amphidromous goby *Sicyopterus japonicus*. *Coastal Mar. Sci.*, 34: 39-41.
- IIDA M., WATANABE S., YAMADA Y., LORD C., KEITH P. & TSUKAMOTO K., 2010b. - Survival and behavioral characteristics of amphidromous goby larvae of *Sicyopterus japonicus* (Tanaka, 1909) during their downstream migration. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 383: 17-22.
- IUCN FRANCE, MNHN, SEOR, ARDA, INSECTARIUM DE LA RÉUNION, GLOBICE & KÉLONIA, 2013. - La liste rouge des espèces menacées en France - Faune de la Réunion. Paris, France. <http://www.uicn.fr/Liste-rouge-faune-Reunion.html>
- JONES G.P., 1986. - Food availability affects growth in a coral reef fish. *Oecologia*, 70: 136-139.
- KEITH P., 2003. - Biology and ecology of amphidromous Gobiidae in the Indo-Pacific and the Caribbean regions. *J. Fish Biol.*, 63: 831-847.
- KEITH P. & LORD C., 2011. - Systematics in Sicydiinae. In: The Biology of Gobies (Patzner R.A., Van Tassell J.L., Kovacic M. & Kapoor B.G., eds), pp. 119-128. Science Publishers, Edenbridge Ltd.
- KEITH P., LORD C. & VIGNEUX E., 2006. - *In vivo* observations on post-larval development of freshwater gobies and eleotrids from French Polynesia and New Caledonia. *Ichthyol. Explor. Freshw.*, 17: 187-191.
- KEITH P., MARQUET G. & WATSON R.E., 2007. - *Stiphodon kalfatak*, a new species of freshwater goby from Vanuatu (Teleostei: Gobioidae: Sicydiinae). *Cybium*, 31: 33-37.

- KEITH P., HOAREAU T.B., LORD C., AH-YANE O., GIMMON-
EAU G., ROBINET T. & VALADE P., 2008. - Characterisation
of post-larval to juvenile stages, metamorphosis and recruit-
ments of an amphidromous goby, *Sicyopterus lagocephalus*
(Pallas) (Teleostei: Gobiidae: Sicydiinae). *Mar. Freshw. Res.*,
59: 876-889.
- KEITH P., MARQUET G., LORD C., KALFATAK D. &
VIGNEUX E., 2010. - Poissons et Crustacés d'Eau douce du
Vanuatu. 253 p. Paris: Société Française d'Ichtyologie.
- KEITH P., MARQUET G., GERBEAUX P., VIGNEUX E. &
LORD C., 2013. - Poissons et Crustacés d'Eau douce de Poly-
nésie. 282 p. Paris: Société Française d'Ichtyologie.
- KUO S.R. & SHAO K.T., 1999. - Species composition of fish in
the coastal zones of the Tsengwen Estuary, with descriptions of
five new records from Taiwan. *Zool. Stud.*, 38: 391-404.
- LAROCHE J.L., RICHARDSON S.L. & ROSENBERG A.A.,
1982. - Age and growth of a pleuronectid, *Parophrys vetulus*,
during the pelagic larval period in Oregon coastal waters. *Fish.*
Bull., 80: 93-104.
- LECOMTE-FINIGER R., 1999. - L'otolithe : "la boîte noire" des
Téléostéens. *Ann. Biol.*, 38: 107-122.
- LEIS J.M. & MCCORMICK M.I., 2002. - The biology, behaviour
and ecology of the pelagic, larval stage of coral reef fishes. *In:*
Coral Reef Fishes: Dynamics and Diversity in a Complex Eco-
system (Sale P.F., ed.), pp. 171-199. San Diego (USA): Elsevier
Science.
- LORD C., BRUN C., HAUTECŒUR M. & KEITH P., 2010. -
Insights on endemism: comparison of the duration of the marine
larval phase estimated by otolith microstructural analysis of
three amphidromous *Sicyopterus* species (Gobioidei: Sicydi-
inae) from Vanuatu and New Caledonia. *Ecol. Freshw. Fish.*,
19: 26-38.
- LORD C., TABOURET H., CLAVERIE F., PÉCHEYRAN C. &
KEITH P., 2011. - Femtosecond laser ablation ICP-MS mea-
surement of otolith Sr:Ca and Ba:Ca composition reveal differ-
ential use of freshwater habitats from three amphidromous
Sicyopterus (Teleostei: Gobioidei: Sicydiinae) species. *J. Fish*
Biol., 79: 1304-1321.
- MAEDA K. & TACHIHARA K., 2004. - Instream distributions and
feeding habits of two species of sleeper, *Eleotris acanthopoma*
and *Eleotris fusca* in the Teima River, Okinawa Island. *Ichthyol.*
Res., 51: 233-240.
- MAEDA K. & TACHIHARA K., 2005. - Recruitment of amphidro-
mous sleepers *Eleotris acanthopoma*, *Eleotris melanosoma*,
and *Eleotris fusca* into the Teima River, Okinawa Island. *Ich-*
thyol. Res., 52: 325-335.
- MAEDA K. & TACHIHARA K., 2006. - Fish fauna in the Teima
Stream, Okinawa Island. *Biol. Mag. Okinawa*, 44: 7-25.
- Maeda K. & Tachihara K., 2010. - Diel and seasonal occurrence
patterns of drifting fish larvae in the Teima Stream, Okinawa
Island. *Pac. Sci.*, 64: 161-176.
- MAEDA K., YAMASAKI N. & TACHIHARA K., 2007. - Size and
age at recruitment and spawning season of sleeper, genus *Eleo-*
tris (Teleostei: Eleotridae) on Okinawa Island, southern Japan.
Raffles B Zool., suppl. 14: 199-207.
- MAEDA K., YAMASAKI N., KONDO M. & TACHIHARA K.,
2008. - Reproductive biology and early development of two
species of sleepers, *Eleotris acanthopoma* and *Eleotris fusca*
(Teleostei: Eleotridae). *Pac. Sci.*, 62: 327-340.
- MCCORMICK M.I. & MOLONY B.W., 1995. - Influence of water
temperature during the larval stage on size, age and body con-
dition of tropical reef fish at settlement. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*,
19: 26-38.
- McDOWALL R.M., MITCHELL C.P. & BROTHERS E.B., 1994.
- Age at migration from the sea of juvenile *Galaxias* in New
Zealand (Pisces: Galaxiidae). *Bull. Mar. Sci.*, 54: 385-402.
- MILTON D., HALLIDAY I., SELLIN M., MARSH R., STAUN-
TON-SMITH J. & WOODHEAD J., 2008. - The effect of habi-
tat and environmental history on otolith chemistry of barramini-
di *Lates calcarifer* in estuarine populations of regulated tropical
river. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 78: 301-315.
- MURPHY C.A. & COWAN J.H., Jr., 2007. - Production, marine
larval retention or dispersal, and recruitment of amphidromous
Hawaiian gobioids: issues and implications. *In: Biology of*
Hawaiian Streams and Estuaries (Evenhuis N.L. & Fitzsimons
J.M., eds). *Bishop Mus. Bull. in Cult. Environ. Stud.*, 3: 63-74.
- NELSON S.G., PARHAM J.E., TIBATTS R.B., CAMACHO F.A.,
LEBERE T. & SMITH B.D., 1997. - Distribution and micro-
habitats of the amphidromous gobies in streams of Micronesia.
Micronesica, 30: 83-91.
- PANNELLA G., 1971. - Fish otoliths: daily growth layers and peri-
odical patterns. *Science*, 173: 1124-1127
- R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014. - R: a language and
environment for statistical computing. (R Foundation for Sta-
tistical Computing, Vienna). Available at <http://www.R-project.org>.
- RADTKE R.L. & KINZIE R.A., III, 1996. - Evidence of a marine
larval stage in endemic Hawaiian stream gobies from isolated
high-elevation locations. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 125: 613-621.
- RADTKE R.L., KINZIE R.A., III & FOLSOM S.D., 1988. - Age at
recruitment of Hawaiian freshwater gobies. *Environ. Biol.*
Fish., 23: 205-213.
- RADTKE R.L., KINZIE R.A., III & SHAFER D.J., 2001. - Tem-
poral and spatial variation in length of larval life and size at
settlement of the Hawaiian amphidromous goby *Lentipes con-*
color. *J. Fish Biol.*, 59: 928-938.
- RESH V.H., MOSER M. & POOLE M., 1999. - Feeding habits of
some freshwater fishes in streams of Moorea, French Polynesia.
Ann. Limnol., 35: 205-210.
- SHAFER D.J., 2000. - Evaluation of periodic and aperiodic otolith
structure and somatic-otolith scaling for use in retrospective
life history analysis of a tropical marine goby, *Bathygobius*
coalitus. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 199: 217-229.
- SHEN K.N., LEE Y.C. & TZENG W.N., 1998. - Use of otolith
microchemistry to investigate the life history pattern of gobies
in a Taiwanese stream. *Zool. Stud.*, 37: 322-329.
- SHEN K.N., LEE Y.C. & TZENG W.N., 2002. - Formation of met-
amorphosis check in otolith of the amphidromous goby *Sicyop-*
terus japonicus. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 228: 205-211.
- SHIAO J.C., LOŽYS L., IIZUKA Y. & TZENG W.N., 2006. -
Migratory patterns and contribution of stocking to the popula-
tion of European eel in Lithuanian waters as indicated by oto-
lith Sr:Ca ratios. *J. Fish Biol.*, 69: 749-769.
- SHIAO J.C., TZENG C.S., LI P.C. & BELL K.N.I., 2015. -
Upstream migration and marine early life history of amphidro-
mous gobies inferred from otolith inclusions and microchem-
istry. *Environ. Biol. Fish.*, 98: 933-950.
- SIROT C., 2009. - Analyse comparative d'otolithes de poissons
amphidromes de milieu tropical insulaire : recherche d'indica-
teurs de qualité des habitats traversés. Master degree disserta-
tion, Master de Sciences et Technologie, 21 p. MNHN, France.
- TABOURET H., BAREILLE G., CLAVERIE F., PÉCHEYRAN
C., PROUZET P. & DONARD O.F.X., 2010. - Simultaneous
use of strontium:calcium and barium:calcium ratios in otoliths
as markers of habitat: application to the European eel (*Anguilla*
anguilla) in the Adour basin, South West France. *Mar. Environ.*
Res., 70: 35-45.

- TABOURET H., LORD C., BAREILLE G., PÉCHEYRAN C. & MONTI D., 2011. - Otolith microchemistry in *Sicydium punctatum*: indices of environmental condition changes after recruitment. *Aquat. Living Resour.*, 24: 369-378.
- TAILLEBOIS L., MAEDA K., VIGNE S. & KEITH P., 2012. - Pelagic larval duration of three amphidromous Sicydiinae gobies (Teleostei: Gobioidae) including widespread and endemic species. *Ecol. Freshw. Fish*, 21: 552-559.
- TAILLEBOIS L., TABOURET H., PÉCHEYRAN C., KEITH P., 2015 - Inputs from microchemistry to the understanding of three Sicydiinae species life cycle. *Vie Milieu*, 65(2): 73-84.
- TEICHERT N., VALADE P., GRONDIN H., TRICHET E., SARDENNE F. & GAUDIN P., 2014. - Pelagic larval traits of the amphidromous goby *Sicyopterus lagocephalus* display seasonal variations related to temperature in La Réunion Island. *Ecol. Freshw. Fish*, doi: 10.1111/eff.12205.
- TZENG W.N., 1996. - Effects of salinity and ontogenetic movements on strontium: calcium ratios in the otoliths of the Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 199: 111-122.
- TZENG W.N. & YU S.Y., 1988. - Daily growth increments in otoliths of milkfish, *Chanos chanos* (Forsskål), larvae. *J. Fish Biol.*, 32: 495-504.
- VALADE P., 2001. - Étude de la reproduction et des premiers stades larvaires du cabot bouche-ronde de l'île de La Réunion en vue de la conception d'aménagements et de mesures de gestion favorisant le franchissement des ouvrages de captage d'eau par les larves lors de la migration d'avalaison. PhD dissertation, Univ. de Montpellier II.
- VIVIER L., CYRUS D.P. & JERLING H.L., 2010. - Fish community structure of the St Lucia Estuarine System under prolonged drought conditions and its potential for recovery after mouth breaching. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 86: 568-579.
- WATSON R.E., KEITH P. & MARQUET G., 2007. - *Akihito vanuatu*, a new genus and new species of freshwater goby from the South Pacific (Teleostei: Gobioidae: Sicydiinae). *Cybium*, 31: 341-349.
- WYRTKI K., 1973. - Physical Oceanography of the Indian Ocean. In: The Biology of the Indian Ocean (Zeitzschel B. & Gerlach S.A., eds), pp. 18-36. Ecological Studies Series, Vol. 3. Berlin: Springer-Verlag.
- YAMASAKI N., MAEDA K. & TACHIHARA K., 2007. - Pelagic larval duration and morphology at recruitment of *Stiphodon percnopterygionus* (Gobiidae: Sicydiinae). *Raffles B Zool. Suppl.*, 14: 209-214.
- YAMASAKI N., KONDO M., MAEDA K. & TACHIHARA K., 2011. - Reproductive biology of three amphidromous gobies, *Sicyopterus japonicus*, *Awaous melanocephalus*, and *Stenogobius* sp., on Okinawa Island. *Cybium*, 35: 345-359.

Research Article

Open Access

Damien D. Hingsinger, Regis Debruyne, Maeva Thomas, Gaël P. J. Denys, Marion Mennesson, Jose Utge, Agnes Dettai

Fishing for barcodes in the Torrent: from COI to complete mitogenomes on NGS platforms

DOI 10.1515/dna-2015-0019

Received March 31, 2015; accepted September 8, 2015

Abstract: The adoption of Next-Generation Sequencing (NGS) by the field of DNA barcoding of Metazoa has been hindered by the fit between the classical COI barcode and the Sanger-based sequencing method. Here we describe a framework for the sequencing and multiplexing of mitogenomes on NGS platforms that implements (I) a universal long-range PCR-based amplification technique, (II) a two-level multiplexing approach (*i.e.* divergence-based and specific tag indexing), and (III) a dedicated demultiplexing and assembling script from an Ion Torrent sequencing platform. We provide a case study of mitogenomes obtained for two vouchered individuals of daces *Leuciscus burdigalensis* and *L. oxyrrhis* and show that this workflow enables to recover over 100 mitogenomes per sequencing chip on a PGM sequencer, bringing the individual cost down below 750€ per mitogenome (as of current 2015 sequencing costs). The use of several kilobases for identification purposes, as involved in the improved DNA-barcode we propose, stress the need for data reliability, especially through metadata. Based on both scientific and economic considerations, this framework presents a relevant approach for multiplexing

samples, adaptable on any desktop NGS platform. It enables to extend from the prevalent barcoding approach by shifting from the single COI to complete mitogenome sequencing.

Keywords: DNA barcoding; mitogenome assembly; Next-Generation Sequencing; sample multiplexing; sequence post-processing

1 Introduction

For over a decade now, the DNA-barcoding effort (*sensu* [1] for Actinopterygian fish species has focused on extensively sequencing the barcode region of the mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 gene (COI) *via* a classical sanger-based approach [2,3]. This identification and preliminary analysis tool for characterizing fish diversity has been very successful thanks to the variability within the COI barcode sequence coupled with taxonomically efficient PCR primers (*e.g.* [4], and the availability of a dedicated, easy to use database to store and analyze the reference sequences: the Barcode of Life Database (BOLD; [5]. It has also brought methodological improvements through the encouraged use of shared, standardized markers and systematic vouchering of specimens attached to the sequences [1,6,7]. The appropriateness of COI as a marker for fish identification has been questioned, and studies have used other mitochondrial markers instead (for instance [8–10], leading to some dispersion of efforts in the search for a more variable and obtainable marker. While there are limitations to the current COI barcoding strategy within metazoans, we consider that over the last twelve years its benefits have been noticeable. Although not perfect, it has provided a clear and unified framework for biodiversity analysis, especially in Actinopterygians where COI has proven appropriate [2,3], although COI lacks variability in some groups [11]. However, the rise of the second-generation sequencing techniques with their ability to generate large amounts of genomic data has increasingly challenged this framework [12], to the point

***Corresponding author: Agnes Dettai**, Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité ISYEB, UMR 7205 CNRS, MNHN, UPMC, EPHE Muséum national d'Histoire naturelle, Sorbonne Universités. 57 rue Cuvier, CP30, 75005 Paris, France, E-mail: adettai@mnhn.fr

Damien D. Hingsinger, Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité ISYEB, UMR 7205 CNRS, MNHN, UPMC, EPHE Muséum national d'Histoire naturelle, Sorbonne Universités. 57 rue Cuvier, CP30, 75005 Paris, France

Jose Utge, Regis Debruyne, Outils et Méthodes de la Systématique Intégrative, UMS 2700, MNHN, CNRS, Muséum national d'Histoire naturelle, Sorbonne Universités. 57 rue Cuvier, CP26, 75005 Paris, France

Maeva Thomas, Gaël P. J. Denys, Marion Mennesson, Unité Biologie des organismes et écosystèmes aquatiques (BOREA, UMR 7208), Sorbonne Universités, Muséum national d'Histoire naturelle, Université Pierre et Marie Curie, Université de Caen Basse-Normandie, CNRS, IRD, 57 rue Cuvier, CP26, 75005 Paris, France

where some authors consider it nothing but outdated and irrelevant [13,14].

The current second-generation sequencing platforms were originally designed to deep sequence individual whole-genome DNA libraries. Thus, they are not directly adapted to the multiplexed targeted sequencing of short genomic fragments like COI barcodes. As some other authors point out [15], this contrasts with the simplicity and immediate efficacy of COI barcode sequencing. One of the greatest difficulties on those platforms pertains to attaching sequence reads/consensuses to actual specimen vouchers while sequencing a cost-effective number of samples, without multiplying sequence tags and their added cost and labwork [16–18]. Methods implementing known indexed libraries in order to demultiplex sequences from individual organisms have indeed proven work-intensive (when PCR-based; [19,20] and/or expensive (when ligation-based) and, despite being productive [21], lack the simplicity and appeal of the Sanger-based sequencing of individual PCRs.

To overcome this problem for the Next Generation Sequencing methods (NGS; [22], several pragmatic approaches intend to improve multiplexing by considering an implicit tagging of the samples based on their sequence divergence, as originally proposed by Pollock et al. [23] in the pre-NGS era. Both PCR-based [16] and PCR-free [17,24] approaches have thus been described. They all make use of the throughput of current NGS platforms to sequence not only the COI barcode sequence but the entire mitogenome, with high multiplexing of individuals. In these new NGS frameworks, currently available COI barcode reference data have proved very useful to guide the *a priori* taxon-multiplexing strategy [17] as well as for *a posteriori* assignation of assembled mitogenomes to the samples. The COI and other mitochondrial sequences are used as ‘baits’ [16,25], and thus the necessary traceability to specimen vouchers is maintained.

In recent years, the number of mitogenome sequence releases in GenBank has considerably risen thanks to increased throughput in new sequencing platforms [7,17,26]. Furthermore, the number of available mitogenomes, and their usefulness for phylogeny at different scales has been particularly well explored in Actinopterygians since the description of the carp mitogenome in 1994 [27]. This is largely due the effort of one team over the last 15 years which is responsible for the publication of more than 1340 fish mitogenomes and the corresponding publications (from [28] to [29] This includes the creation of Mitofish and MitoAnnotator, a dedicated database and its annotation tool for fish mitogenomes [30]. Consequently, Actinopterygians are currently the

second best represented vertebrate group after mammals in mitogenome sequence number in NCBI Nucleotide, and the first in number of represented species (figure 1). Since the COI barcode belongs to the mitochondrial genome, it exhibits the same evolutionary characteristics. Thus both have the same advantages: unambiguous orthology and uniparental inheritance facilitating their use within bifurcating phylogenetic approaches [29,31,32], as well as high levels of phylogenetic content with somewhat uniform evolutionary rates [33]. But they also have the same limitations: potential species paraphyly, lineage-specific rates of evolution and base compositions [34].

We promote here an affordable and easy approach to develop actinopterygian mitogenomics still further, by sequencing complete or large fragments of mitogenomes using next generation sequencing technologies and two-level multiplexing. In the line of Timmermans et al. [16], Kane et al. [35], Dettai et al. [17] and Strohm et al. [7], we discuss how this could represent an extension of the original barcode marker for more precise identification of vouchers and metagenomics, while remaining fully compatible with the previously obtained mitochondrial datasets. We describe briefly the mitogenomes derived from the presented workflow for two specimens from species of daces endemic to the South-West of France, *Leuciscus burdigalensis* Valenciennes 1844 and *Leuciscus oxyrrhis* (La Blanchère 1873), as an example of improvements for barcoding, phylogeographic and taxonomic studies. We also evaluate the presence of sequences of mitogenomic origin in 11 complete fish nuclear genomes available in the ENSEMBL database to assess the risk of sequencing NUMTs instead of the desired mitogenomes.

2 Methods

2.1 Dedicated Teleost long-range PCR amplification of mitogenomes

We set out to amplify the complete mitochondrial genome for organisms of various groups of local research interest largely spread within teleosts: Cyprinidae, Esocidae, Cottidae, Nototheniidae, Gobiidae, Eleotridae, Lampridae, and Zoarcidae. We downloaded complete mitochondrial sequences from NCBI Nucleotide for species from these groups and aligned them using ClustalW (with default settings; [36]). Conserved sequence regions (identified by eye) were subsequently imported into Oligo 4.1 Primer Analysis Software (National BioScience Inc., Plymouth).

Efficient long-range PCR amplifications require a particular attention to primer design, with a few general

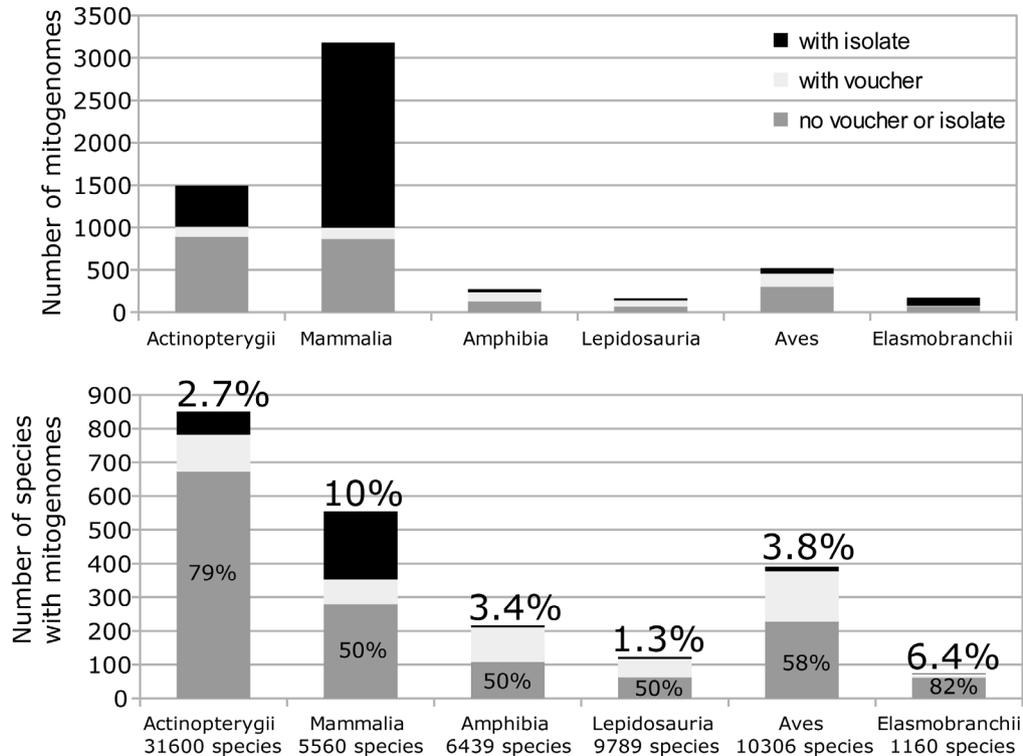


Figure 1: Number of mitogenome sequences and species represented in NCBI GenBank (last checked 02/03/2015). We searched GenBank (excluding Refseq sequences) using ‘groupe name complete mitochondrion’ and filtering by sequence length between 12,000 and 25,000. For Mammalia *Homo sapiens* was excluded. To evaluate how many listed a reference to a voucher, voucher was added as a search word, and to evaluate the number listing only an isolate reference but no voucher, we used (voucher OR isolate), with the number evaluated for voucher subtracted. Total species numbers are given under the Y axis (source: <http://www.catalogueoflife.org/col/browse/tree/id/21835362>). Percentage of total species represented indicated above the bars, percentage of species with sequence and no voucher or isolate indicated on the bar.

recommendations often being the key to success. We thus took care to select primers with little or no self- or heterodimer hybridization, and closely matching annealing temperatures with primer melting temperatures selected between 65 and 70°C. We also used existing 12S rDNA primers [37]. Primers are provided in table 1, and also available in the BOLD primer database.

In order to complete the mitogenome amplification, we generally amplified 3 overlapping fragments (Figure 2). We used an in-house modified protocol of the HotStart LongAmp® Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich MA): PCR reactions were performed in 18 µl volume including 5X LongAmp Taq Reaction Buffer, 0.4 ng/ul Bovine Serum Albumin, 3.5% DMSO, 300 nM of each primer, 300 µM of dNTPs, and 1 unit of LongAmp Taq polymerase. After an initial denaturation of 30 s at 94°C, the DNA was amplified through 45 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 62.5°C, and 15 min at 65°C, with a terminal elongation for 15 min at 65°C. Whenever the amplification was not straightforward with pre-selected generic primers, specific primers were designed to fit the

specific mutations of the problematic group. Additional primers for Cottidae and Gasterosteidae are listed in table 1, with the modifications highlighted. The PCRs were visualized on ethidium bromide stained agarose gel, and we estimated the amounts for pooling from the intensity of the bands [16], taking into account PCR size and using one of our own PCRs as intensity standard across gels. Within each taxon, a variable number (2 to 20) of PCRs of nuclear markers of phylogenetic interest (Rag1, IRBP, Pkd1, S7...) were also added in the individual pools to maximize sequencing efficiency.

2.2 Two-level multiplexing of individual mitogenomes in libraries

The first level of taxonomic multiplexing in our approach involves the pooling of long-range PCR between species for distantly-related fishes (Figure 3). These pools contained on average 8 mitogenomes for which molarity was roughly equalized based on agarose gel quantitation. We update our library preparation protocol slightly to

Table 1: Primers for the long PCRs, with primers adapted to Gasterosteidae and Cottidae included. For these, the modified bases are in bold black. Annealing temperature is 62.5°C for all.

Primer name	5'-3' sequence	Publication
12S-L1091R	AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT	Kocher et al.(1989)
12S-H1478	TGACTGCAGAGGGTGACGGCGGTGTGT	
12S-H1481-Acanth	TTGGG GAGAGTGACGGCGRTGTGT GCG	
MtH20	GCCCATTTCAACATCTTCAGTGTTA	This study
MtL8	TTAACTAAAGCATAACACTGAAGATGT	
MtL5231	TAGATGGGAAGGCTTCGATCCTACA	
MtL5231-Cottus	TAGATGGGTAGGCCTCGATCCTACA	
MtL5231-Gast	TAGCTAGGCAGGCCTCGATCCT GCA	
MtL5247	GATCCTACAAACTCTTAGTTAACAGCTA	
MtH7045	CTTGAAACCAGTTTATGGGGGTTTC	
MtH7061	GGGTATGTGGCTGGCTTGAAC	
MtH7061-Acanth	CGGTATGTGGTTGGCTTGAAC	
MtL9563	TCTACGTCTCCATCTACTGATGAGG	
MtH9621	CAAGACCGGTGATTGGAAGTCA	
MtH11944	CATAGCTTTACTTGGATTGCACCA	
MtH11944-Gast	CATTTYACTCCTACTTGGATTGCACCA	
MtL11910	CAGCTCATCCATTGGCTTAGGAAC	
MtL11910-Gast	CAGCTCATCCATTGGACTTAGGATC	
MtH15027	GGCTTACAAGACCGGCGCTC	
MtL15023	GCCAGAGCGCGGTCTTGTA	

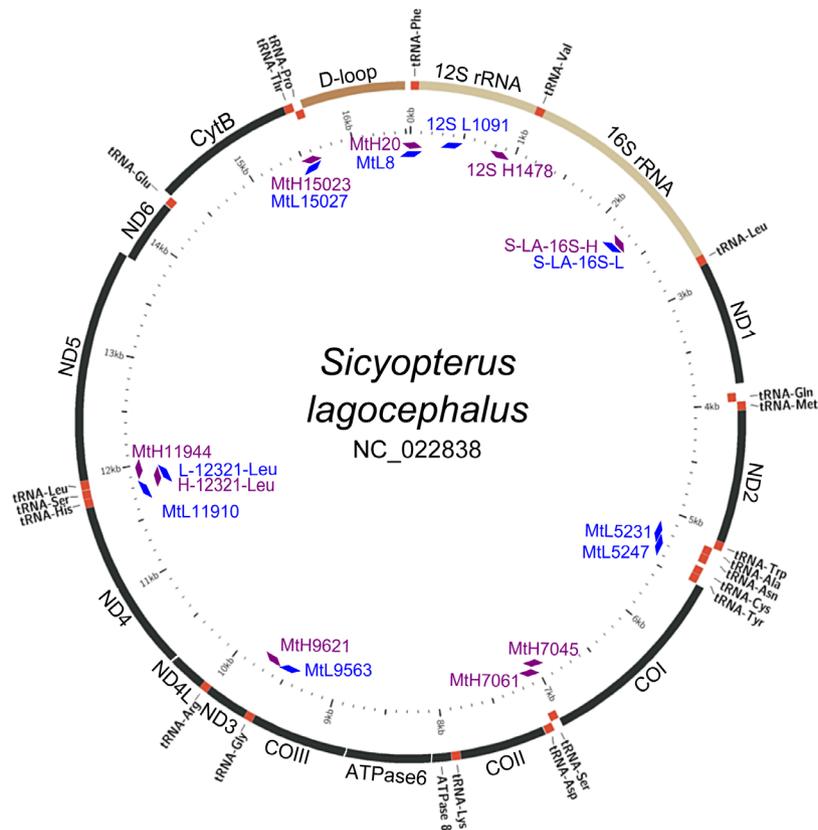


Figure 2: Position of the primers on the mitogenome of *Sicyopterus lagocephalus* (Chiang et al. 2013). Modified from a figure generated by Mitofish using Circos.

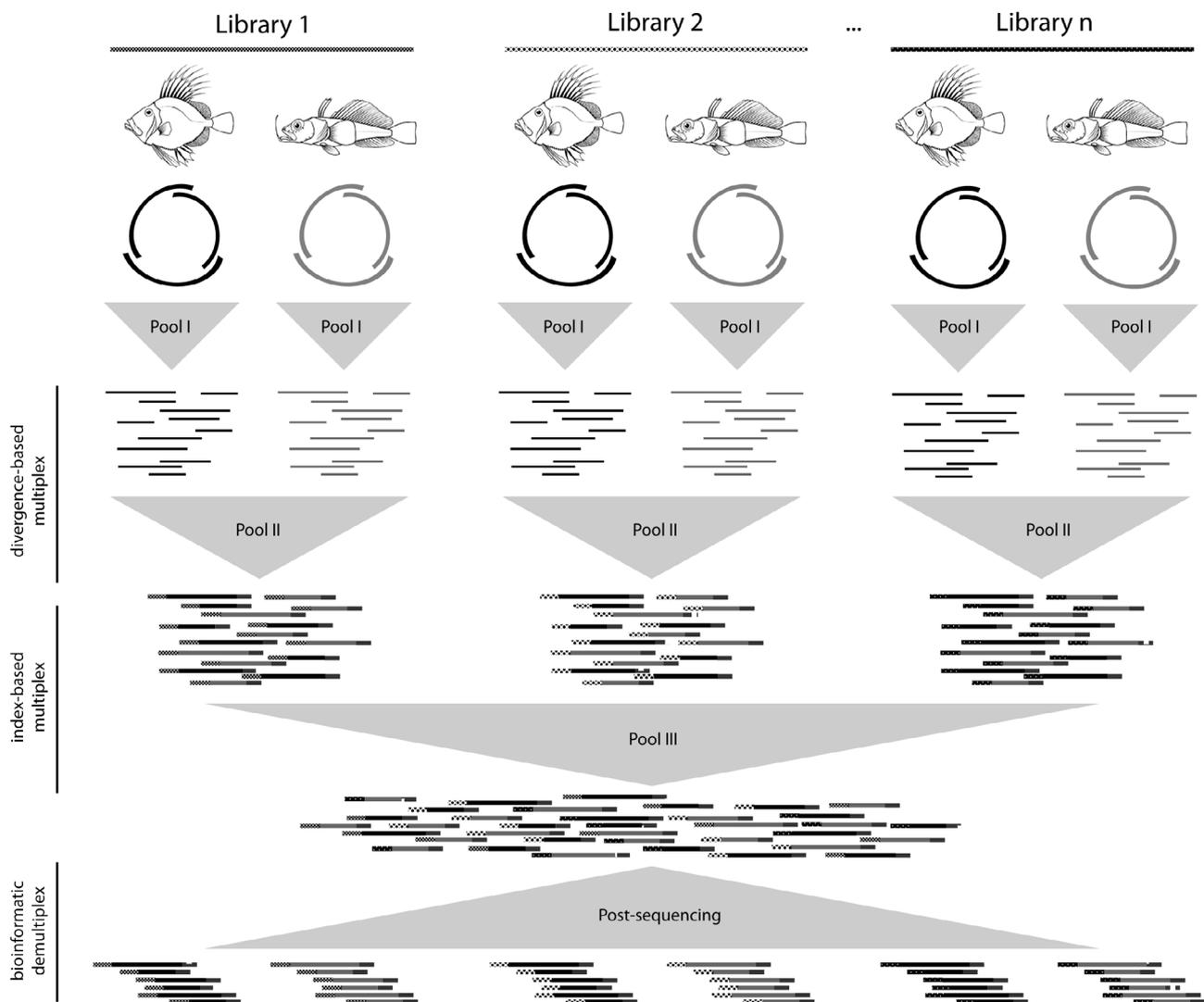


Figure 3: Synoptic figure of the global workflow. Tagged libraries are represented by a specific motif corresponding to their barcoded adapter. Divergent fish groups display DNA in light and dark shades of grey. The three pool stages and two multiplexing stages are shown.

improve quality, facilitate preparation and minimize the cost of individual libraries. We describe here the latest, most successful iteration of the protocol. Pooled PCRs were equalized to a final volume of 100 μ l and sheared on a bioruptor standard (Diagenode, Liège, Belgium) for 20 minutes (with 30 seconds on/off intervals, on the HI setting, under constant cooling at 4°C). Initial attempts to fragment DNA of lower pool volumes (30–40 μ l) yielded poorly reproducible results. Forty microliters of the fragmented DNA were processed in the next steps.

The second level of multiplexing relies on the indexing of DNA libraries prior to sequencing. We used the NEBNext fast DNA library prep protocol (ver 4.1) scaling down the reaction volumes to 50% to reduce the cost, in parallel with the Ion Xpress barcodes (Life

Technologies, Carlsbad California). We performed the final library size selection with a double SPRI protocol using the NucleoMag paramagnetic separation beads (Macherey-Nagel, Düren, Germany) first with 0.55 bead/DNA ratio and then 0.15, to select fragments compatible with the 400 bp sequencing kit of the PGM platform. After separate quantitation of indexed libraries using the Ion Taqman quantitation kit (with reagents volumes scaled down to 1:2; Life technologies), an equimolar pool of 20 tagged libraries was amplified and sequenced on a 316v2 sequencing chip for the Ion Torrent PGM platform (with an expected throughput of at least 1M reads), so that, on average, a total of 160 mitogenomes were targeted on each chip (Figure 3).

2.3 Demultiplexing and assembly of individual mitogenomes

In order to automate most of the sequence reads post-processing, we produced a set of linux shell scripts (available on request; Figure 4). The main script (MitoPip_v1.sh) was called with the folder containing the raw sequences (either in .fastq or .bam output format from the Torrent server) and the first and last library to analyze (allowing partial analysis of a partially filled

chip) as parameters. All the parameters required for steps invoked in the script were read from the “main_config.txt” file. We used relaxed criteria (Kmer in 9-55, coverage cut-off of 5) in Oases 0.2.08 [38], (Kmer in 47-127 with a step of 10, a max read length of 1000, average insert size of 200, reverse_seq, asm_flags, rank and map_en set to 0, 3, 1 and 128, respectively) in SOAPdenovo2 r240 [39], and (Ion Torrent set as the sequencing technology with minimum read length = 100, no quality check, minimum relative score = 95) in MIRA 4.0.2 [40] for the first round

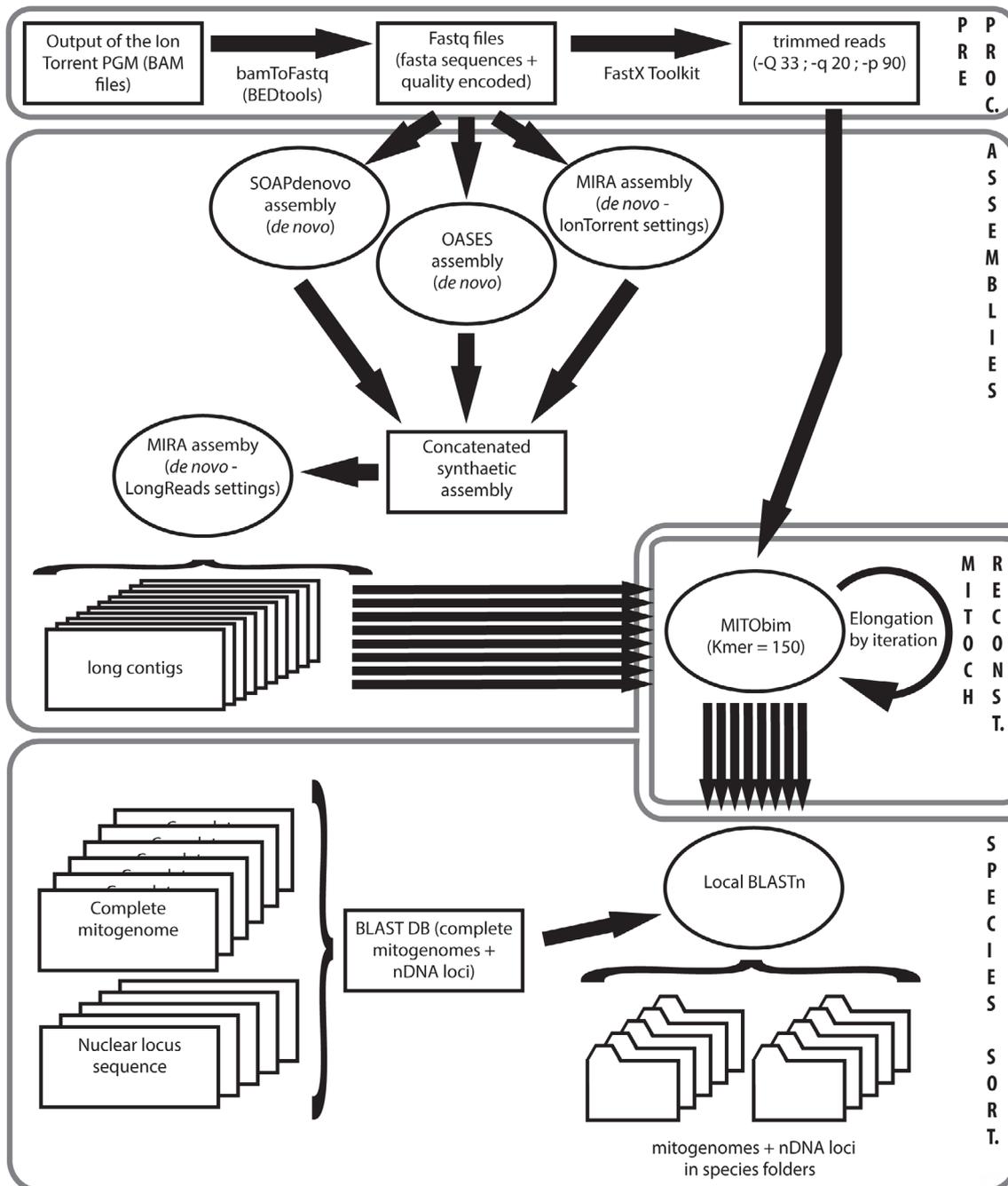


Figure 4: Schematic illustration of the steps of the post-sequencing pipeline.

Table 2: Sequencing cost breakdown. Prices are given in € as of early 2015 reagents costs.

long-range PCR (NEB)	per chip	per library	per mitogenome
PCR	108	5,4	0,6
DNA library prep	180	9	1
DNA Library quantitation	100	5	0,6
Template preparation and 316v2 sequencing (400 bp)	750	37,5	4,5
TOTAL (rounded cost)	1138	56,9	7,1

of assembly. We kept only the resulting contigs comprised between 200 and 20,000 bp for the subsequent analyses. Then, we produced long contigs (LC) performing a second round of MIRA assembly (Sanger sequencing technology, -NW:cmrnl = no, -HS:nrr = 5, -SK:mmhr = 10, -AS:epoq = no, a minimum relative score of 90 and a minimum_read_length of 100). We implemented a slightly modified version of MITObim v1.7 [25] for Ion Torrent data (k_bait = 150, readlength = 250, insertsize = 400, available on request) to elongate the LC as multiple starting seeds (using the -quick option in MITObim), using reads cleaned with FastX toolkit 0.0.13 (>80% of bp with quality >20) as input data. We included other options for MITObim analysis, allowing the use of up to three short sequences as seeds (such as COI, 16S or cytB with the -quick option) or a related complete available mitogenome as a reference for mapping. As a final check for taxonomic assignment, we BLASTed the elongated LC against a customized local BLAST database including all available mitogenomes for the studied groups using BLASTn 2.2.29+ [41]; www.BLAST.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi, keeping only the best hit (e-value < 10⁻³ and identity > 85% threshold).

Finally, the species-specific long contigs and reconstructed mitogenomes were sorted in folders according to species for users analyses. The mitogenomes and contigs are then imported in Geneious v7.0 [42], checked against the sequence libraries they were extracted from for coverage and quality, and the smaller contigs are user-assembled.

2.4 Coverage analysis

In order to analyse the effect of the sequence coverage over the quality of the assembled mitogenomes, we compared actual datasets obtained for 9 *Esox* specimens sequenced on differently tagged libraries, with several read subsets of our best covered *Esox* mitogenome: specimen BRO-506, from the same sequencing run. From the sequence reads obtained for this specimen, we used 14,022 reads to generate the reference sequence: we assembled a single mitogenomic contig that we subsequently trimmed down to 14,034 bp by excluding the highly variable control

region holding sequence repeats.

Read subsamples were generated using the Downsample SAM/BAM tool of NGS Picard Tools (Broad Institute) as implemented within Galaxy (ver 15.02; [43] with 5 samples each (with random seed) for probabilities ranging from 0.01 up to 0.50 of the original 14,022 reads. Reads subsamples were subsequently mapped onto the *Esox* reference sequence, to derive several metrics: breadth and depth of coverage, and error rates statistics in the assembled consensus sequence. In practice, the error rate was calculated as the percentage of changes in the consensus sequence of the covered fraction of the mitogenome for each read subsample when compared to the reference sequence built from all the reads.

2.5 Case study of two *Leuciscus* species

To document the actual efficiency of our global workflow, we selected two adult specimens from French endemic *Leuciscus* species as a practical example. The vouchers from the Languedoc Roussillon region corresponding to vouchers *Leuciscus oxyrrhis* MNHN-IC-2010-1839 from Tarnon stream at Florac (Lozère, Garonne drainage) and *Leuciscus burdigalensis* MNHN-IC-2010-1830 from the Agly river at Latour-de-France (Pyrénées Orientales) were identified morphologically with the criteria given by Kottelat and Freyhof [44]. Fish finclips (for other species, fin clips/tissue from newly collected to six years old were used instead) preserved in 95% ethanol were used to extract DNA. Several types of extraction were tested on the other samples, including CTAB extraction [45] and automated extraction using an Eppendorf epMotion 5075 with NucleoSpinR 96 Tissues kits (Macherey–Nagel) following the instructions of the manufacturer.

The sequences were checked with the assemblies using Geneious v7.0 and compared with closely-related published mitogenomes and the COI sequences corresponding to the specimens [46]. We controlled the protein translations of the coding genes and performed automatic annotation using MitoAnnotator and comparison with published *Leuciscus* mitogenomes. The complete mitogenomes are deposited in GenBank

(accession numbers KT223567 and KT223568) and in the BOLD (Project MtBA, sample numbers FFFtag4075 and FFFtag4059).

2.6 Search for long NUMTs in fish mitogenomes

The osteichthyan nuclear genome sequences available in the ENSEMBL database were blastN-queried through the BLAT/BLAST portal, using the mitogenome sequence for the corresponding species retrieved from NCBI nucleotide, and search sensitivity adjusted for “Distant homologies”. The only fish species not queried was *Poecilia formosa*, for which no mitogenome was available for the same species. As we are trying to evaluate the presence of long NUMTs, only sequences longer than 1000 bp were retrieved and aligned to the query sequences using MUSCLE [47]. Genomic location was recorded, and the sequences were checked through blast search in NCBI (nucleotide nr database).

3 Results

3.1 Primers and Long Range Amplification success

The three main PCR amplifications generated fragments around 6.7 kilobases (Figure 2). The three fragments all included coding genes with good reference datasets: Mt1 (best primer pair: 12SL1091 with MtH7061) and Mt2 (best primer pair: MtL5231 with MtH11944) overlapped over the whole COI sequence, while Mt3 (MtL11910 with 12SH1478) included the complete Cytochrome b.

DNA extracted by two methods and extractions up to six years old yielded long PCRs, with better success rates for CTAB extracts than for robot and kit extractions. Amplification was successful across Teleostei, but some taxa were problematic for some primer pairs. However, the primer adaptation approach proved both fast and effective. The large reference data available for Actinopterygii (Figure 1) provides easy primer verification by comparison with closely-related taxa and modification when and where necessary before ordering or PCR-testing. The new primers are presented in table 1, with primers adapted to Gasterosteidae and Cottidae included as examples of the primer adaptation. The Mt1 and the Mt3 fragments overlap by more than 400 bp in the 12S, Mt1 and Mt2 overlap over the whole COI coding sequence, and Mt2-Mt3 still overlap over 10 bp once the primers are removed. Species where gene order was modified need adjustment of the primers used together so they bracket

a reasonably-sized sequence fragment. In some groups, the control region was an obstacle, including for PCR. For instance, pike mitogenomes control regions include a low complexity, 100% AT 157 bp fragment that prevented correct PCR and sequencing. This region is also missing in two out of the three pike mitogenomes available in GenBank. Primers surrounding the control region helped amplify the rest of the mitogenome.

3.2 Sequence production and post-processing using our pipeline

The latest iteration of sequencing yielded 1,351,350 usable reads on a 316v2 chip for a total of 255M bp. Once demultiplexed per index, tagged libraries provided between 22,118 and 156,300 reads each (7-fold difference). The median read length for these libraries was consistently around 200 bp.

As an example, considering library 5 of chip 3, the 156,159 raw reads (mean length = 226 bp, max length = 997 bp) resulted in 115,523 cleaned reads after trimming (average length = 235 bp). The contigs number and mean length for the Oases, SoapDenovo and MIRA assemblies were 12,984, 1,550 and 2,224 and the length 617 bp (range 100-25657 bp), 177 bp (range 58-3156 bp) and 395 bp (range 101-9107 bp) respectively. The composite assembly comprised 2092 long-contigs of 711 bp mean length (range 100-14910 bp), of which 1000 were subsequently analysed. MITObim increased this length to 11296 bp (164-36,704 bp), with 182 contigs longer than 14 kb. These elongated LC were assigned to 18 species (326 sequences unambiguously assigned, 10 species comprising at least 5 sequences).

3.3 Coverage analysis

We used simulated subsamples of *Esox* to investigate the change of three parameters: breadth of coverage, depth of coverage and consensus error rates, according to the number of reads per individual mitochondrial library (Figure 5). The simulations reveal that the breadth of coverage of the mitogenome sequence increases rapidly from about 75% to beyond 99% when the number of sequence reads increases between 100 and 1,000 (*i.e.* subsamples of 1 to 10% of the original reads; Figure 5A), and the depth of coverage increases from around 2X up to 20X (Figure 5B). This increase is accompanied by a drastic reduction in consensus error rates: from almost 3% down to 0.1-0.2% (Figure 5A). Further increase in the number of reads assembled only produced a marginal improvement for the contig length and quality. The reference coverage

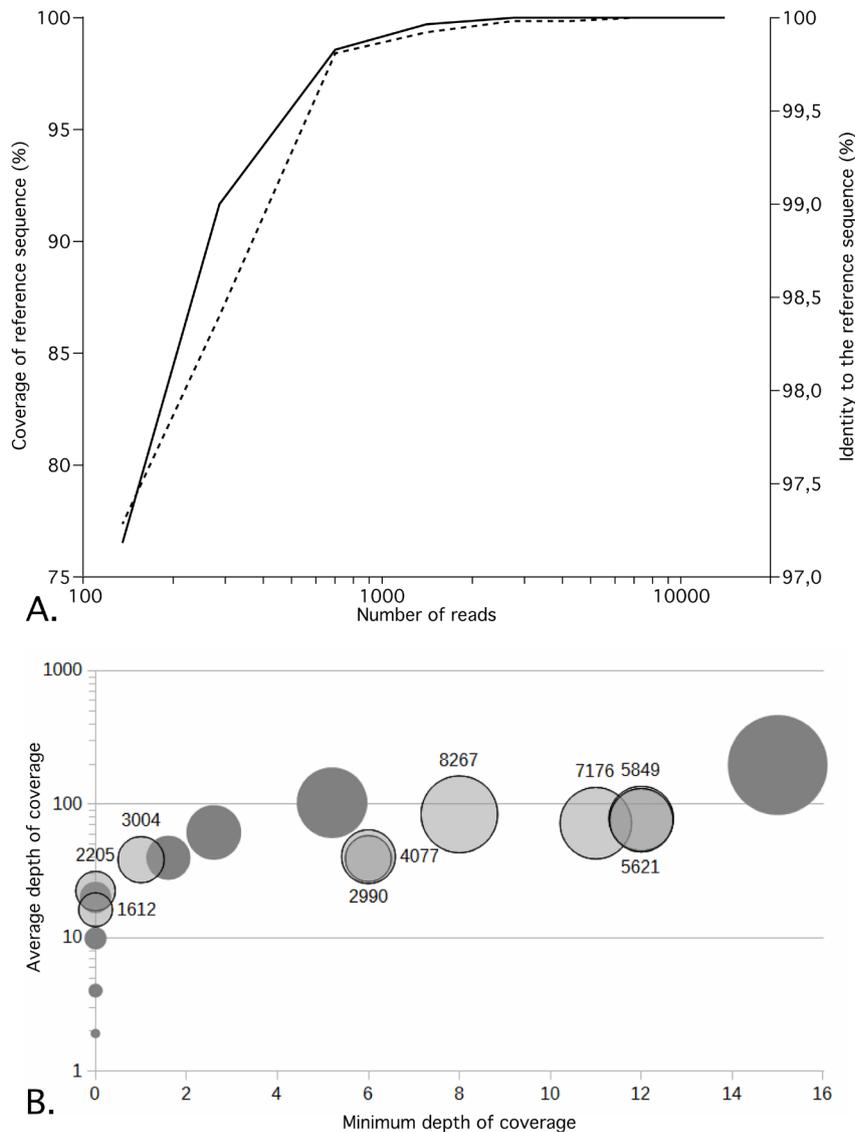


Figure 5: Results of the coverage analysis based on simulated re-samples of BRO-506 and actual *Esox* data. Evolution of the breadth of coverage (solid line; left scale) and of the sequence identity to the *Esox* reference sequence (dashed line; right scale) based on the amount of subsampled reads (in abscissa). B: Bubble plot for the depth of coverage (minimum x-axis, average in y-axis). the size of the bubble reflects the number of assembled reads: 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50 and 100% of the 14,022 reads for the *Esox* reference displayed in dark grey; the total amount of assembled reads for the other *Esox* specimens is displayed next to their light grey bubble.

is always complete for about 3,000 reads (about 40X coverage), while 4,000 reads (60X) are necessary to remove the remnant errors from the consensus. Deeper sequencing of the mitogenome then only affects the coverage depth which reaches a minimum value of 16X and an average of 160.9X when using 100% of the *Esox* reads.

3.4 Two mitogenomes of *Leuciscus* spp.

The amplifications worked with the recommended three pairs of primers, for three fragments of 6.7 kb. After

primers and quality trimming (Geneious by default trim parameters, 100% bp with $Q > 40$), 6951 (mean depth 59.1, range 10-480) and 4703 (mean depth 39.4, range 4-200) reads remained in *L. oxyrrhis* and *L. burdigalensis* assembly, respectively.

The consensus mitogenomic sequences from both dace samples exhibit the exact same length (16,006 base pairs) and positions of start and end for all coding and non-coding regions. Of the 37 differences observed between the two specimens, only three are reflected in the amino acid sequence (supplemental figure SF1). All but two of the 37 differences between the two mitogenome

sequences are shared with at least another individual from the same drainage (data not shown). The Folmer region of COI had been sequenced previously using Sanger sequencing for both specimens [46], and the sequences are identical with the sequences from our assemblies. This is also the case for all other mitogenomes sequenced for which we already had the barcode region ($N > 150$). For this fragment, the two sequences are nested within a *Leuciscus burdigalensis* cluster on a BOLD COI distance tree. There are no SNPs in this region between the individuals of the two species. We performed a BLAST search using the cytochrome b sequences. The closest hits were from unvouchered samples identified as *Leuciscus leuciscus* (Linnaeus 1758) from the area [48]. However, there were no samples identified as *Leuciscus burdigalensis* or *oxyrrhis* in GenBank for *Cytochrome b*. The direction and order of genes is identical to those of most fish mitochondrial genomes, and the size of the coding genes is identical to the two *Leuciscus* sequences available currently in the RefSeq (NC_018825.1 and NC_024528.1; ST1). The sequence available for the most closely-related species according to Costedoat et al. [48], *L. idus* (Linnaeus 1758) has an unverified status in GenBank (KF913024.1, [49]). It displays a frame-shift at the end of the ND2 gene that is absent in our sequences and the RefSeq sequences of the two more distant species. The ML phylogenetic tree showed a high similarity between the two specimens (0.0021 substitutions per site). However, considering the two specimens together, the group they formed displayed a branch length (0.0329) similar to that exhibited by the other species (ranging from 0.0174 - *L. idus* - to 0.0541 - *L. waleckii*; supplemental figure SF2). The tree displays the relationships expected from previous publications on the group, and has the same topology as the COI fragment alone.

3.5 NUMTs in complete fish genomes

The results of the NUMT searches are presented in additional table ST1. While the “complete” fish genomes are in fact not fully sequenced nor assembled, we expect to find some sequences corresponding to NUMTs, with varying sizes and sequence divergence from the current mitogenome sequence for the species, depending on the size of the integrated sequence size and the age of the integration. These sequences are expected to have, at least in some cases, flanking sequences of non-mitochondrial origin, and to be part of larger scaffolds containing also other sequences. For *Astyanax mexicanus*, *Oreochromis niloticus*, *Lepisosteus oculatus*, and *Danio rerio*, all blast hits are shorter than 261 bp. For the other species, there

are longer results (ST1), but always constituted exclusively of sequences that can be aligned with mitochondrial sequences. There were no flanking sequences in any of these, these sequences are not integrated within larger scaffold containing other sequences.

4 Discussion

4.1 General applicability and specific efficiency for teleosts

Some of the limitations in the classical COI-based barcoding hinge on the definition of working PCR primers for COI amplification. Sanger sequencing, because of the limited sequence length, imposes the definition of primers every 600-800 base pairs, whether the region is conserved or not across taxa. Combining long PCRs and next-generation sequencing supports selecting primers in interestingly conserved regions because the sequencing size restriction is relaxed.

While our primers work largely from Cyprinids to Carangids through pikes, the variability in the mitogenome is high, and some groups like Gasterosteidae or Cottidae could not be amplified using the original set. There are additional mitochondrial long PCR primers available from previous publications [50–52], for instance). However, our primer pairs amplify smaller fragments, and make it possible to use older or lower quality, more fragmented DNA, as well as cheaper brands of long fragment amplification Taq polymerase (i.e. three PCR reactions using our protocol cost less than one euro). Within minutes, based on the wealth of mitogenome sequences available in NCBI nucleotide for Actinopterygians, new primers adapted to specific groups can be designed by slightly modifying the described primers to better fit the mitogenome sequences from the group of interest at the same position. This basic adaptation does not require primer design expertise. It was sufficient for Gasterosteidae or Cottidae, and can probably be applied successfully to groups of local interest.

Most Actinopterygian mitogenomes present the same gene order [29], but some have undergone gene order changes, as first described by Miya and Nishida [53]. They can be quite frequent in some families like Myctophidae [54]. These gene order changes are prone to problems for PCR-based approaches, although changing primer combinations can be effective. Moreover, in some species, parts of the mitogenome, and especially the control region, contain patterns within the sequence like low complexity areas, composition biases or duplications.

These can impact PCR and sequencing success [55,56]. However these issues can be anticipated when sequences are available by checking the mitogenome description publications and the sequences themselves, like with the long low-complexity region in pike or the duplicated control region in Nototheniidae [57]. Obtaining the complete mitogenome might reveal very difficult for some species, and might not be worth the effort, as long mitogenomic fragments might already provide sufficient information. We designed primers flanking the control region for such cases.

NUMTs can be a serious issue in mitochondrial-focused molecular studies, although relatively few have been found in the sequenced genomes of teleost fishes ([58] but see [59,60]), and empirical records of NUMTs are thus limited (e.g. 1/242 spp. in [61]). The available complete genome data do not provide a complete panel of NUMTs that might be present in those genomes, for various reasons (i.e. assembly problems, incomplete coverage etc.). However, it is striking that in none of the complete genomes queried, we could recover any sequence showing some similarity to those mitogenomes while assembled to a larger scaffold of nuclear sequences, or even included between non mitochondrial flanking sequences. Despite there were hits similar to mitochondrial stretches longer than 1000 bp in six of the 10 nuclear genomes analyzed, none of them was ever assembled within larger scaffolds, suggesting fragments not integrated in the nuclear genomes or even artefacts. Blast searches for these sequences also shared characteristics that suggest they are not integrated in a nuclear genome: their similarity is higher to mitogenomes from other, divergent individuals of the same species, or even different species (e.g. a 6000 bp mitochondrial sequence of squirrel was actually recovered from the *Oreochromis niloticus* genome). Divergences are concentrated in the sequence ends, where most sequencing artefacts happen. Ambiguous base strings (N) separated sequence regions with different results in BLAST searches (Takifugu for instance). In agreement with previous publications, these results still suggest that longer NUMTs are rare in actinopterygian genome.

Therefore this approach, like others approaches based on long PCRs and mitogenome sequencing, considerably limits the risk of integrating unrecognized nuclear insertions of mitochondrial DNA (NUMTs) into the datasets [62]. Indeed, carefully checking our primers pairs against the “known” NUMTs in the three species studied in Antunes & Ramos [58] resulted in no possible amplification, due to the lack of similarity for both the forward and reverse primers into the nuclear inserted fragment (results not shown). Moreover, MITOBim was

designed to properly handle NUMTs potentially found in genome skimming approach, and our approach including a MITOBim iterative mapping benefit from this robustness. Multi-bands PCR [63], sequence ambiguities in the assembled genome (especially where the PCR fragment overlaps), or SNP resulting in frameshift or stop codons are signs of potential problems, whether or not prior occurrence of NUMTs has been suspected in the group of study. Distance or phylogenetic trees are precious tools to detect possible problems. An unexpected position in the topology of a phylogenetic reconstruction, or different positions in trees derived from the three different PCRs [64] should also be carefully checked. If NUMTs are suspected, the primers pairs producing the longest fragment should be preferentially used [63,65,66].

4.2 Demultiplexing

Very few methods have been proposed for *in silico* demultiplexing of pooled mitogenome (but see [18,67]), although several approaches were designed for reconstructing mitogenome from directly sequenced genomic DNA (i.e. without PCR for specific sorting of the mtDNA nor mtDNA enrichment): e.g. MITObim [25], MIA [68], or IMAGE [69]. To our knowledge, the method we propose herein is the first to make use of both pooled and PCR-amplified mitogenome. Contrary to Timmermans et al. (2010), MIRA was not able to retrieve complete or nearly complete mitogenomes from the cleaned reads. This was expected: the reads from the Timmermans study were from 454 sequencing (374 bp mean length for the second run), whereas we dealt with shorter reads (on average 235 bp for the presented *Leuciscus* species) using Ion Torrent, and read length have an impact on mitogenome reconstruction [17]. In order to counterbalance this smaller read lengths, and to avoid assembler-specific bias, we used several assemblers designed for transcriptomics, as the copy number profile for each PCR fragment from each mitogenome resembles locus expression variation more closely than genomic DNA [24]. The process explores a large range of K-mer, and finally combines the output, similarly to the assembly of Sanger shotgun reads. In addition, we tuned MITOBim to more stringency by increasing the K-mer length to 150, following to Dettai et al. (17). This resulted in very few chimeric mitogenomes (generally longer than 20 kb) that could be easily identified.

Timmermans et al. (16) and Dettai et al. (17) proposed somewhat symmetrical methods to use the COI barcodes in mitogenome multiplex sequencing. While Dettai et al. make use of the divergence of existing COI barcodes as a

guide prior to sample multiplexing, Timmermans et al. used COI barcodes generated from the actual samples as baits to identify *a posteriori de novo* assembled genomes. Clearly, these two strategies are not mutually exclusive and can be used sequentially to improve the overall efficiency of the multiplex/demultiplex operational stages.

This strategy yields a lot of sequences, and can be upgraded still by pooling nuclear PCRs with the mitochondrial ones at the first stage of library preparation. This does not impact the overall process, and locus demultiplexing remains obvious because of the high divergence between mitochondrial and nuclear phylogenetic markers. However, when pooling multiple taxa for a single nuclear marker, the lower variability of the nuclear markers must be taken into account, and species that could be safely combined for the highly divergent mitochondrial markers might be too similar for some nuclear markers. It is safer to perform a preliminary analysis using available sequences for the groups considered for multiplexing with sliding window analysis [17]. As PCR length is not limiting for this type of sequencing, it is particularly interesting to amplify larger fragments for nuclear markers too. For instance, using the outermost primers for IRBP and Pkd1 [70] allows the easy sequencing of respectively 2.5 and 2.3 kilobases for these markers, and the Rag1 fragment of 1.6 kb popular for teleost phylogenetics can be sequenced without internal primers.

Finally, it is interesting to highlight that other sequence manipulation and analysis programs, alongside or instead of Geneious, could be used for the final step of sequence checking, like CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). Most of the biodiversity-related labs already have licences for such assemblers/aligners, so the post-sequencing migration from COI to complete mitochondrial is far easier than trying to adapt COI to NGS [16].

4.3 Coverage

Our current experimental setup relies on the multiplexing of 20 indexed libraries per 316v2 PGM chip. This chip has a guaranteed throughput of 1M reads, so provides an average 50,000 sequence reads per indexed library. Each indexed library being composed of on average 8-10 mitogenomes, a single mitogenome can be covered roughly with 5,000 reads, just with the guaranteed minimum. This approach is therefore a good fit for sequencers generating a small volume of longer sequences, like 454 GSjunior, Ion Torrent PGM, or single Illumina Mi-Seq lanes.

Our strategy for multiplexing “only” ~160 mitogenomes per sequencing chip can appear conservative. Based on

our coverage analyses, it appears that an average of 3,000 reads per mitogenome is enough to complete correct mitogenome sequences, so that up to 400 mitogenomes could be sequenced on a single 316v2 chip in theory. However, our approach relies on a rough quantitation of PCR concentrations to save time and reagents, and therefore has to take into account potential larger discrepancies in the sequence coverage both within and between organisms. There are indeed three potential levels where equimolarity of samples is needed: (I) when pooling separate PCRs for single individuals, (II) when pooling different organisms within indexed libraries, and (III) when performing the final pooling of indexed libraries prior to emPCR. The evaluation using intensity of the PCR bands on gels is sufficient for the first two (Timmermans et al. (16), this study), in addition to being fast and cheap. For the third, we rely on a taqman quantitation of the 20 individual libraries prior to pooling which, in practice, only maintains the variation in reads per library within a 10-fold factor. Therefore, our conservative approach warrants that a maximum number of (if not all) pooled mitogenomic sequences can be reconstructed safely with a high level of confidence. The low cost of the present approach makes re-sequencing a PCR with a too low coverage a better alternative than a precise quantitation of the hundreds of combined PCRs.

Furthermore, coverage can be impacted by sequence composition, and especially extreme composition biases [55,56]. Such biases are sometimes present in mitochondrial genomes, the *Esox lucius* control region contains a 157 base pairs long 100% AT stretch (genbank accession: NC_004593.1). For such cases, sequencer choice is important, as some platforms are less sensitive to some types of biases and patterns [56].

4.4 Adapting barcode sequencing to NGS one step further

Adapting the targeted Sanger sequencing of COI barcodes to NGS platforms does not take advantage of the actual design and benefits of these platforms, and would be an expensive and work-intensive endeavour. Extension to mitogenomes and large genomic fragments is a logical step forward [16–18,23] and does considerably increase identification precision. As we show here, mitogenomes are easily obtainable for Actinopterygians. COI barcode sequence variability can also be too low between populations, or even species pairs [71,72], *Leuciscus* spp in this study). In these low divergence cases, having access to a larger number of informative sites limits stochastic effects and has beneficial effects on the robustness

of the results [73]. For our *Leuciscus* sequences, the Folmer region was identical for the two individuals. The complete mitochondrial genome presented 37 differences, of which 35 were informative when compared to three additional fishes from the same drainage. This higher variability adds support for both identifications and phylogenetic reconstruction, especially for species with very little intra and interspecific variability, like cod [71], antarctic Nototheniidae [72] or tuna [74]. However, optimal exploitation of this variability also requires more information about the origin of the samples (i.e. specimen metadata).

4.5 Data reliability

Sequence data reliability, and especially specimen identification, has been a longstanding problem, and GenBank's reliability in this matter is notoriously low. Strohm et al. (2015) recently evaluated the number of possible mis-identifications of mitogenomes. Thirteen percents of the Perciformes sequences checked clustered with another species in BOLD, and therefore represent possible misidentifications. The presence in the mitogenomes of many popular sequence markers makes them easily comparable to the existing reference datasets, and identification evaluation is fast and generally very efficient [7,31]. This should be standard verification for all mitogenome sequences, although the results can be difficult to interpret if there are taxonomic problems in the group. Our PCR fragments contain either COI (Mt1 and Mt2) or Cytochrome b (Mt3), and there is overlap between the fragments to check the consistency between the different PCRs from an individual.

The difficulty to obtain a correct identification of specimens is compounded in Actinopterygians because of cryptic and unidentified diversity, including in “well known” faunas like European or North American freshwater fishes [46,75–78]. The Barcode of Life standards have popularized the consistent [6] use of voucher specimens and specimen metadata attached to the sequences. While the conservation of whole specimens as vouchers requires long-term, adapted storage facilities, the benefits are on multiple levels [1,2,79]. Voucher specimens support re-evaluation of morphological identification, and can be used as a base for a new taxonomic study if the systematics of the group are in doubt, as is the case in a large number of fish species. Our *Leuciscus* sequences provide an example of this. BLAST search for Cytochrome b with our sequences retrieved sequences from the same drainages, but identified as *Leuciscus leuciscus* and non-vouchered. These sequences were published in 2006 [48],

and the authors concluded that there were several lineages of dace. In 2007, Kottelat and Freyhoff [44] published a revision based on morphology only of the freshwater fish of Europe. Their revision reestablished *L. burdigalensis*, *L. oxyrrhis* and *L. bearnensis* (Blanchard 1866), and we used their criteria to identify the specimens included here. A revision in an integrative framework of French daces is still needed using an integrative taxonomy approach [80], and it might result in additional changes. Thus even acting on the best knowledge at a given time point, attribution to a species can be questioned later on with new, more precise data. This is not an isolated case: in the study of Strohm et al. (2015), 42% of the sequences matched to more than one species, and therefore require further evaluation. Yet corrections in GenBank are difficult at best [81], and do not encourage the rectification of identifications to keep up with current taxonomic knowledge. The data access and visualization processes in BOLD are much more conducive to a dynamic correction.

Currently, only a small proportion of the sequences and the mitogenomes available in GenBank are linked to a voucher specimen (Figure 1). Worse, for 79% of mitogenome sequences neither a voucher nor an isolate number are given, indications of geographical origin, and even more complete metadata, are also rare [7]. This limits their use for other applications like phylogeography and multi-marker analyses, as it is impossible to know which individual has been sequenced for a marker, and the various alleles of nominal species can be non-monophyletic for some loci [82]. Some mitogenome sequences have even been assembled from several individuals, sometimes without indications that this is the case [7]. Aggregating sequences of unknown source and potentially different individuals (some of which might be misidentified) to “represent” the species for different markers is problematic theoretically and even practically for smaller evolutionary scales, and when an insufficient number of individuals per species is studied [82], whether for identification or systematics. The mitogenome presents a very high number of SNPs between individuals [21,29,71], and all the markers are physically linked, so composite sequences should be avoided even carefully. The mitogenome is a single unit with one history, that can therefore be considered a single marker, and as has been shown repeatedly, one marker is not enough for species delineation [32] nor reconstructing species history [82]. To move beyond this single marker requires being able to reliably put data together, and that means knowing whether the sequences come from the same individuals or not. Transposing the Barcoding of Life standards [6] for link to voucher, locality, and sample number would be a considerable improvement, especially

if the sequences are to be used for smaller scale studies where incomplete lineage sorting and coalescence need to be taken into account. It is also crucial that the voucher or sample identification is clearly listed both in the paper and in the molecular databases.

5 Conclusion

The search for relevant, multi-locus, genome-wide based barcodes are certainly key in the near future. Yet the continuous documentation of the ever-growing COI barcode database is highly relevant for identification and biological inventories, and are today the base for further in-depth molecular analysis of taxa. The extension of barcode to mitogenomes is now technically easy, compatible with the previous barcoding efforts, and can build on more than a thousand mitogenome sequences across actinopterygians. This dataset can now be densified at smaller scale [29] with an unprecedented precision level for a single and largely comparable marker.

These easily obtained complete or almost complete mitogenome sequences open new venues for applications in phylogenetics, identification, and metagenomics. It is obvious that this approach and its variations can be transposed to any other biological entity of interest for mitogenome sequencing, as shown by previous publications [16,18] and tests using the same protocols on insects and birds performed at the MNHN. When analyzed using appropriate concepts and methods, the mitogenome data can also be used for larger scale phylogenetics, but more interestingly for small scale biogeography and integrative taxonomy studies as well [21,29,71]. It provides an interesting complement to nuclear sequence data because of its contrasting maternal inheritance, higher mutation rate, and lack of recombination leading to a lower effective population size (N_e). However it still represents only the maternal lineage, so groups where introgression is frequent like temperate freshwater fishes would benefit even more from standardized nuclear markers for identification, and these can easily be sequenced using the present approach too. For instance, *Leuciscus idus* shares mitochondrial sequences with dace *Leuciscus leuciscus* [48], and some pickerel species also share mitochondrial sequences (*Esox niger* Lesueur 1818 and *E. americanus americanus* Gmelin 1789; [75]). No doubt we will discover other such groups as the range of fish studied in depth grows. However, all these uses rely on avoiding creating chimeric sequences from several individuals, as well as accurate metadata including sample reference, locality of capture and date,

and preferably vouchering of the specimens [7].

With the growing popularity of metagenomics, the high number of copies per cell and high resolutive power of a mitogenome reference dataset are very promising. Instead of relying on happenstance to recover COI sequences during PCR-free metagenome sequencing, any sequence from the mitogenome represented in the tested sample can do [16–18]. The mitogenome reference datasets are therefore a promising tool at all levels of biodiversity: within species, between species, and to study ecosystems. Simple techniques for acquisition of multiple sequences for low cost helps to move from the deluge of the simple description of mitogenomes publications [26]

Currently, the Barcode of Life database does not accommodate full mitogenomes. It does accept a maximum of 13 mitochondrial markers deposited separately, though. From our experience, the sample description format in BOLD promotes completion and correction of sample metadata through the available, pre-listed categories better than the less user-friendly entry and correction process in NCBI nucleotide. A reference mitogenomic dataset would perfectly complement existing resources in BOLD, and probably ameliorate accompanying metadata deposition.

Acknowledgments: This work was supported by the Action Thématique du Muséum (ATM) “Génomique & Collections” and by the Fondation TOTAL (project “Classification des poissons marins: les téléostéens acanthomorphes”). We thank the Service de Systématique Moléculaire (part of the Plateforme Analytique du Muséum, Muséum national d’Histoire naturelle) for granting access to its molecular platform. We are grateful to the lab engineers (Céline Bonillo, Delphine Gey and Josie Lambourdière) in the continuous support and help to implement this work in the new routines of the SSM. We thank also Henri Persat (Lyon I University), Frédéric Melki and Benjamin Adam (Biotope), the French National Agency for Water and Aquatic Environments (Onema) as well as the Associations agréées de pêche et de protection des milieux aquatiques (AAPPMA) of Florac and Saint-Paul-de-Fenouillet for the fish sampling. We are grateful to JF Dejouannet for illustrations used in figure 3. We thank Gael Lancelot for language corrections of the manuscript.

Contributions of the authors: AD has designed the theoretical framework of this project. AD, MT, MM and GD have produced the original PCR data and produced the DNA libraries. JU and RD have performed template preparation and sequencing. DH has designed, programmed and tested the post-processing bioinformatics and scripts.

DH, RD, AD, GD analyzed the data presented. DH, RD and AD produced the figures and tables. All the authors participated to the writing and editing of the manuscript.

Conflict of interest: Authors declare nothing to disclose.

References

- [1] Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R., Biological identifications through DNA barcodes, *Proc. Biol. Sci.*, 2003, 270, 313–21
- [2] Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R., Hebert P.D.N., DNA barcoding Australia's fish species, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2005, 360, 1847–57
- [3] Ward R.D., Hanner R., Hebert P.D.N., The campaign to DNA barcode all fishes, *FISH-BOL*, *J. Fish Biol.*, 2009, 74, 329–56
- [4] Becker S., Hanner R., Steinke D., Five years of FISH-BOL: brief status report, *Mitochondrial DNA*, 2011, 22 Suppl 1, 3–9
- [5] Ratnasingham S., Hebert P.D.N., BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>), *Mol. Ecol. Notes.*, 2007, 7, 355–64
- [6] Hanner R., Data standards for BARCODE records in INSDC (BRIs). 2009. <http://www.barcoding.si.edu/PDF/Guidelines%20for%20non-CO1%20selection%20FINAL.pdf>
- [7] Strohm J.H.T., Gwiazdowski R.A., Hanner R., Mitogenome metadata: current trends and proposed standards, *Mitochondrial DNA*, 2015, 1–7
- [8] Garcia-Vasquez E., Perez J., Martinez J.L., Pardinas A.F., Lopez B., Karaiskou N., et al., High level of mislabeling in spanish and greek hake markets suggests the fraudulent introduction of African species, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 475–80
- [9] Von der Heyden S., Barendse J., Seebregts A.J., Matthee C.A., Misleading the masses: detection of mislabeled and substituted frozen fish products in South Africa, *ICES J. Mar. Sci.*, 2010, 176–85
- [10] Naylor G.J.P., Caira J.N., Jensen K., Rosana K.A.M., White W.T., Last P.R., A DNA sequence-based approach to the identification of shark and ray species and its implications for global elasmobranch diversity and parasitology, *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 2012, 2012
- [11] Dettai A., Adamowicz S.J., Allcock L., Arango C.P., Barnes D.K.A., Barratt I., et al., DNA barcoding and molecular systematics of the benthic and demersal organisms of the CEAMARC survey, *Polar Sci.*, 2011, 5, 298–312
- [12] Pompanon F., Samadi S., Next generation sequencing for characterizing biodiversity: promises and challenges, *Genetica.*, 2015, 143, 133–8
- [13] Taylor H.R., Harris W.E., An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding, *Mol. Ecol. Resour.*, 2012, 12, 377–88
- [14] Downton M., Meiklejohn K., Cameron S.L., Wallman J., A preliminary framework for DNA barcoding, incorporating the multispecies coalescent, *Syst. Biol.*, 2014, 63, 639–44
- [15] Collins R.A., Cruickshank R.H., Known Knowns, Known Unknowns, Unknown Unknowns and Unknown Knowns in DNA Barcoding: A Comment on Downton et al., *Syst. Biol.*, 2014, 63, 1005–9
- [16] Timmermans M.J.T.N., Dodsworth S., Culverwell C.L., Bocak L., Ahrens D., Littlewood D.T.J., et al., Why barcode? High-throughput multiplex sequencing of mitochondrial genomes for molecular systematics, *Nucleic Acids Res.*, 2010, 38, e197
- [17] Dettai A., Gallut C., Brouillet S., Pothier J., Lecointre G., Debruyne R., Conveniently Pre-Tagged and Pre-Packaged: Extended Molecular Identification and Metagenomics Using Complete Metazoan Mitochondrial Genomes, *PLoS One*, 2012, 7, e51263
- [18] Tang M., Tan M., Meng G., Yang S., Su X., Liu S., et al., Multiplex sequencing of pooled mitochondrial genomes—a crucial step toward biodiversity analysis using mito-metagenomics, *Nucleic Acids Res.*, 2014, gku917
- [19] Meyer M., Stenzel U., Hofreiter M., Parallel tagged sequencing on the 454 platform, *Nat. Protoc.*, 2008, 3, 267–78
- [20] Bybee S.M., Bracken-Grissom H., Haynes B.D., Hermansen R.A., Byers R.L., Clement M.J., et al., Targeted amplicon sequencing (TAS): a scalable next-gen approach to multilocus, multitaxa phylogenetics, *Genome Biol. Evol.*, 2011, 3, 1312–23
- [21] Feutry P., Kyne P.M., Pillans R.D., Chen X., Naylor G.J., Grewe P.M., Mitogenomics of the Spertooth Shark challenges ten years of control region sequencing, *BMC Evol. Biol.*, 2014, 14, 232
- [22] Shendure J., Ji H., Next-generation DNA sequencing, *Nat. Biotechnol.*, 2008, 26, 1135–45
- [23] Pollock D.D., Eisen J.A., Doggett N.A., Cummings M.P., A case for evolutionary genomics and the comprehensive examination of sequence biodiversity, *Mol. Biol. Evol.*, 2000, 17, 1776–88
- [24] Rubinstein N.D., Feldstein T., Shenkar N., Botero-Castro F., Griggio F., Mastrotoaro F., et al., Deep Sequencing of Mixed Total DNA without Barcodes Allows Efficient Assembly of Highly Plastic Ascidian Mitochondrial Genomes, *Genome Biol. Evol.*, 2013, 5, 1185–99
- [25] Hahn C., Bachmann L., Chevreux B., Reconstructing mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing reads—a baiting and iterative mapping approach, *Nucleic Acids Res.*, 2013, gkt371
- [26] Smith D.R., The past, present and future of mitochondrial genomics: have we sequenced enough mtDNAs?, *Brief. Funct. Genomics*, 2015, elv027
- [27] Chang Y.S., Huang F.L., Lo T.B., The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome, *J. Mol. Evol.*, 1994, 38, 138–55
- [28] Miya M., Kawaguchi A., Nishida M., Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: a case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences, *Mol. Biol. Evol.*, 2001, 18, 1993–2009
- [29] Miya M., Nishida M., The mitogenomic contributions to molecular phylogenetics and evolution of fishes: a 15-year retrospect, *Ichthyol Res.*, 2015, 62, 29–71
- [30] Iwasaki W., Fukunaga T., Isagozawa R., Yamada K., Maeda Y., Satoh T.P., et al., MitoFish and MitoAnnotator: a mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline, *Mol. Biol. Evol.*, 2013, 30, 2531–40
- [31] Botero-Castro F., Delsuc F., Douzery E.J.P., Thrice better than once: quality control guidelines to validate new mitogenomes, *Mitochondrial DNA*, 2014

- [32] Dupuis J.R., Roe A.D., Sperling F.H., Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: one marker is not enough, *Mol. Ecol.*, 2012, 21, 4422–36
- [33] Papadopoulou A., Anastasiou I., Vogler A.P., Revisiting the Insect Mitochondrial Molecular Clock: The Mid-Aegean Trench Calibration, *Mol. Biol. Evol.*, 2010, 27, 1659–72
- [34] Li H., Shao R., Song N., Song F., Jiang P., Li Z., et al., Higher-level phylogeny of paraneopteran insects inferred from mitochondrial genome sequences, *Sci. Rep.*, 2015, 5
- [35] Kane N., Sveinsson S., Dempewolf H., Yang J.Y., Zhang D., Engels J.M.M., et al., Ultra-barcoding in cacao (*Theobroma* spp.; Malvaceae) using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA, *Am. J. Bot.*, 2012, 99, 320–9
- [36] Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, 4673–80
- [37] Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Pääbo S., Villablanca F.X., et al., Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6196–200
- [38] Schulz M.H., Zerbino D.R., Vingron M., Birney E., Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels, *Bioinforma. Oxf. Engl.*, 2012, 28, 1086–92
- [39] Luo R., Liu B., Xie Y., Li Z., Huang W., Yuan J., et al., SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler, *GigaScience*, 2012, 1, 18
- [40] Chevreur B., Wetter T., Suhai S., Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information., *Comput. Sci. Biol. Proc. Ger. Conf. Bioinforma, GCB 99.*, 1999, 45–56
- [41] Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., Basic local alignment search tool, *J Mol Biol.*, 1990, 215, 403–10
- [42] Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., et al., Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data, *Bioinforma. Oxf. Engl.*, 2012, 28, 1647–9
- [43] Goecks J., Nekrutenko A., Taylor J., Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences, *Genome Biol.*, 2010, 11, R86
- [44] Kottelat M., Freyhof J., Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat., Berlin: Kottelat, Cornal & Freyhof, 2007.
- [45] Winnepeninckx B., Backeljau T., De Wachter R., Extraction of high molecular weight DNA from molluscs, *Trends Genet.*, 1993, 9, 407
- [46] Geiger M.F., Herder F., Monaghan M.T., Almada V., Barbieri R., Bariche M., et al., Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes, *Mol. Ecol. Resour.*, 2014, 14, 1210–21
- [47] Edgar R.C., MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32, 1792–7
- [48] Costedoat C., Chappaz R., Barascud B., Guillard O., Gilles A., Heterogeneous colonization pattern of European Cyprinids, as highlighted by the dace complex (Teleostei: Cyprinidae), *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2006, 41
- [49] Wang F., Niu J., Hu S., Xie P., Liu C., Li H., et al., The complete mitochondrial genome of *Leuciscus idus* (Cypriniformes: Cyprinidae), *Mitochondrial DNA.*, 2014
- [50] Jun G Inoue M.M., Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese eel *Anguilla japonica*, *Fish. Sci.*, 2001, 67, 118–25
- [51] Kawaguchi A., Miya M., Nishida M., Complete mitochondrial DNA sequence of *Aulopus japonicus* (Teleostei: Aulopiformes), a basal Eurypterygii: longer DNA sequences and higher-level relationships, *Ichthyol. Res.*, 2001, 48, 213–23
- [52] Kim I.-C., Kweon H.-S., Kim Y.J., Kim C.-B., Gye M.C., Lee W.-O., et al., The complete mitochondrial genome of the javeline goby *Acanthogobius hasta* (Perciformes, Gobiidae) and phylogenetic considerations, *Gene*, 2004, 336, 147–53
- [53] Miya M., Nishida M., Organization of the Mitochondrial Genome of a Deep-Sea Fish, *Gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes): First Example of Transfer RNA Gene Rearrangements in Bony Fishes, *Mar. Biotechnol. N. Y. N.*, 1999, 1, 416–0426
- [54] Poulsen J.Y., Byrkjedal I., Willassen E., Rees D., Takeshima H., Satoh T.P., et al., Mitogenomic sequences and evidence from unique gene rearrangements corroborate evolutionary relationships of myctophiformes (Neoteleostei), *BMC Evol. Biol.*, 2013, 13, 111
- [55] Dohm J., Lottaz C., Borodina T., Himmelbauer H., Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing, *Nucleic Acids Res.*, 2008, 36
- [56] Ross M.G., Russ C., Costello M., Hollinger A., Lennon N.J., Hegarty R., et al., Characterizing and measuring bias in sequence data, *Genome Biol.*, 2013, 14, R51
- [57] Zhuang X., Cheng C.H., ND6 gene “lost” and found: evolution of mitochondrial gene rearrangement in Antarctic notothenioids, *Mol. Biol. Evol.*, 2010, 27, 1391–403
- [58] Antunes A., Ramos M.J., Discovery of a large number of previously unrecognized mitochondrial pseudogenes in fish genomes, *Genomics*, 2005, 86, 708–17
- [59] Venkatesh B., Dandona N., Brenner S., Fugu genome does not contain mitochondrial pseudogenes, *Genomics*, 2006, 87, 307–10
- [60] Hazkani-Covo E., Zeller R.M., Martin W., Molecular Poltergeists: Mitochondrial DNA Copies (numts) in Sequenced Nuclear Genomes, *PLoS Genet.*, 2010, 6, e1000834
- [61] Zhang J., Hanner R., Molecular Approach to the Identification of Fish in the South China Sea, *PLoS One*, 2012, 7, e30621
- [62] Kawahara R., Miya M., Mabuchi K., Near T.J., Nishida M., Stickleback phylogenies resolved: evidence from mitochondrial genomes and 11 nuclear genes, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2009, 50, 401–4
- [63] Sorenson M.D., Quinn T.W., Numts: A challenge for avian systematics and population biology, *The Auk*, 1998, 115, 214–21
- [64] Collura R.V., Stewart C.B., Insertions and duplications of mtDNA in the nuclear genomes of Old World monkeys and hominoids, *Nature*, 1995, 378, 485–9
- [65] Sato A., O’Hugin C., Figueroa F., Grant P.R., Grant B.R., Tichy H., et al., Phylogeny of Darwin’s finches as revealed by mtDNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, 96, 5101–6

- [66] Hwang U.W., Park C.J., Yong T.S., Kim W., One-step PCR amplification of complete arthropod mitochondrial genomes, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2001, 19, 345–52
- [67] Pons J., Bauzà-Ribot M.M., Jaume D., Juan C., Next-generation sequencing, phylogenetic signal and comparative mitogenomic analyses in Metacrangonyctidae (Amphipoda: Crustacea), *BMC Genomics*, 2014, 15, 566
- [68] Green R.E., Malaspina A.-S., Krause J., Briggs A.W., Johnson P.L.F., Uhler C., et al., A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing, *Cell*, 2008, 134, 416–26
- [69] Tsai I., Otto T., Berriman M., Improving draft assemblies by iterative mapping and assembly of short reads to eliminate gaps, *Genome Biol.*, 2010, 11, R41
- [70] Dettai A., Lecointre G., New insights into the organization and evolution of vertebrate IRBP genes and utility of IRBP gene sequences for the phylogenetic study of the Acanthomorpha (Actinopterygii: Teleostei), *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2008, 48, 258–69
- [71] Carr S.M., Marshall H.D., Intraspecific Phylogeographic Genomics From Multiple Complete mtDNA Genomes in Atlantic Cod (*Gadus morhua*): Origins of the “Codmother,” Transatlantic Vicariance and Midglacial Population Expansion, *Genetics*, 2008, 180, 381–9
- [72] Dettai A., Lautredou A.-C., Bonillo C., Goimbault E., Busson F., Causse R., et al., The actinopterygian diversity of the CEAMARC cruises: Barcoding and molecular taxonomy as a multi-level tool for new findings, *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, 2011, 58, 250–63
- [73] Rokas A., Carroll S.B., More genes or more taxa? The relative contribution of gene number and taxon number to phylogenetic accuracy, *Mol. Biol. Evol.*, 2005, 22, 1337–44
- [74] Miya M., Friedman M., Satoh T.P., Takeshima H., Sado T., Iwasaki W., et al., Evolutionary Origin of the Scombridae (Tunas and Mackerels): Members of a Paleogene Adaptive Radiation with 14 Other Pelagic Fish Families, *PLoS ONE.*, 2013, 8, e73535
- [75] April J., Mayden R.L., Hanner R.H., Bernatchez L., Genetic calibration of species diversity among North America’s freshwater fishes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011, 108, 10602–7
- [76] Denys G.P.J., Dettai A., Persat H., Hauteœur M., Keith P., Morphological and molecular evidence of three species of pikes *Esox* spp. (Actinopterygii, Esocidae) in France, including the description of a new species, *C. R. Biol.*, 2014, 337, 521–34
- [77] Kneibelsberger T., Dunz A.R., Neumann D., Geiger M.F., Molecular diversity of Germany’s freshwater fishes and lampreys assessed by DNA barcoding, *Mol. Ecol. Resour.*, 2014
- [78] Hubert N., Hanner R., Holm E., Mandrak N.E., Taylor E., Burrige M., et al., Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes, *PLoS One.*, 2008, 3, e2490
- [79] Brodersen J., Seehausen O., Why evolutionary biologists should get seriously involved in ecological monitoring and applied biodiversity assessment programs, *Evol. Appl.*, 2014, 7, 968–83
- [80] Padial J.M., Miralles A., De la Riva I., Vences M., The integrative future of taxonomy, *Front. Zool.*, 2010, 7, 1–16
- [81] Karp P.D., What we do not know about sequence analysis and sequence databases, *Bioinformatics*, 1998, 14, 753–4
- [82] Funk D.J., Omland K.E., Species level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA, *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 2003, 34, 397–423

Supplemental Material: The online version of this article

(DOI: 10.1515/dna-2015-0019) offers supplementary material.

Résumé : Les rivières des milieux insulaires de l'Indo-Pacifique sont colonisées par des espèces amphidromes, majoritairement Gobiidae et Eleotridae. Chez ces espèces, les adultes vivent et pondent en milieu dulçaquicole ; après l'éclosion, les larves dévalent les rivières jusqu'à atteindre le milieu marin où elles vont effectuer une partie de leur croissance et se disperser. Après 3 à 9 mois passés en mer, les post-larves recrutent en estuaire, se métamorphosent et colonisent les rivières. Les *Eleotris* (Teleostei: Gobioidae: Eleotridae) constituent un maillon clé dans ces systèmes de par leur statut de prédateur mais ils sont très peu étudiés. Leur taxonomie n'a jamais été approfondie et reste confuse. L'étude morpho-méristique des types et de spécimens récents nous a permis de mettre en place une première clé de détermination des *Eleotris* valides de l'Indo-Pacifique ainsi qu'une aide à l'identification des post-larves d'*E. fusca*, *E. acanthopoma* et *E. melanosoma*. A partir de l'étude taxonomique morphologique et moléculaire (*COI* et mitogénome partiel), nous avons pu mettre en évidence la présence de nombreuses espèces cryptiques au sein du genre *Eleotris*. La corroboration de ces résultats a permis de valider les patterns de papilles sensorielles céphaliques situés sur les opercules comme critères diagnostiques. A la suite de ces travaux, nous avons pu valider parmi les 34 noms d'espèces répertoriés 16 noms d'espèces dont 6 sont des nouvelles espèces. Nous avons pu montrer que la phylogénie moléculaire du genre reflétait l'évolution des papilles sensorielles operculaires. Cette phylogénie a aussi mis en évidence un complexe «*fusca*», composé de deux espèces, *E. fusca* et *E. klunzingerii*, pour lesquelles le cycle amphidrome a été validé par ablation laser et la phylogéographie et la dispersion larvaire ont été étudiées. A partir des études de phylogéographie nous avons constaté que 2 espèces à large répartition (*E. fusca* et *E. acanthopoma*) pouvaient présenter des flux de gènes entre les populations très différents ceci pouvant s'expliquer par la présence ou non de barrières à la dispersion. Les durées de vie larvaire en mer observées chez *E. fusca*, à partir de l'étude des otolithes, n'ont montré aucune différence selon les localités (océan Pacifique) tandis que des différences significatives ont été observées chez *E. klunzingerii* dans l'océan Indien. L'ensemble des résultats de cette thèse devraient permettre aux gestionnaires des pêches et de l'environnement de mieux appréhender ce groupe complexe.

Abstract: Insular river systems of the Indo-Pacific area are mostly inhabited by amphidromous species; two fish families are predominant: Gobiidae and Eleotridae. These gobioids spawn in freshwater. After hatching, free embryos drift downstream to sea, where the pelagic larval phase takes place. After this marine pelagic phase, which extends from 3 to 9 months, individuals (post-larvae) return to rivers (recruitment phase) to grow and reproduce. *Eleotris* species (Teleostei: Gobioidae: Eleotridae) are important contributors of the diversity of freshwater communities but they are scarcely studied. The taxonomy of the genus has not been thorough and remains disordered. The morpho-meristic study of the types and sampled specimens allowed us to implement a first determination key to valid *Eleotris* from the Indo-Pacific and produce a guide to for *E. fusca*, *E. acanthopoma* and *E. melanosoma* post-larvae identification. The taxonomic morphologic and molecular (*COI* and partial mitogenome) studies highlighted numerous cryptic species into the genus *Eleotris*. The corroboration of these results permits to validate the cephalic free neuromast patterns on the cheek as diagnostic criteria. Among the 34 *Eleotris* species names, 16 are valid with 6 new species. We showed that the molecular phylogeny reflected the free neuromast patterns on the cheek. This phylogeny also highlighted a “*fusca*” complex composed of 2 species: *E. fusca* and *E. klunzingerii*, whose amphidromous cycles have been validated and whose phylogeography and larval dispersion have been studied. Phylogeographic studies showed high differences in gene flux between populations for 2 widespread species (*E. fusca* and *E. acanthopoma*) which could be explained by the presence or lack of dispersal barriers. Pelagic larval durations of *E. fusca* showed no difference between localities (Pacific Ocean) while significant differences were observed for *E. klunzingerii* in the Indian Ocean. The results presented in this PhD thesis will allow fishing and environment managers to better understand this complex group.