

**ÉTUDE DE L'HYBRIDATION INTROGRESSIVE ENTRE
CHONDROSTOMA T. TOXOSTOMA ET *CHONDROSTOMA N. NASUS*
(TÉLÉOSTÉEN, CYPRINIDAE) EN UTILISANT UNE APPROCHE MULTIPLE**

par

Caroline COSTEDOAT (1), Nicolas PECH (1), Rémi CHAPPAZ (1),
Marie Dominique SALDUCCI (1), Puy LIM (2) & André GILLES (1)

RÉSUMÉ. - L'introduction d'espèces envahissantes et la destruction d'habitats naturels sont les principales causes de l'extinction des téléostéens durant le siècle dernier. L'introduction d'espèces peut représenter un danger pour la survie des espèces endémiques, tant au niveau écologique (compétition, prédation,...) que sur le plan génétique, notamment suite aux phénomènes d'hybridation et d'introgession qui ne font qu'exacerber la situation. C'est le cas de l'espèce endémique *Chondrostoma t. toxostoma* qui s'hybride avec l'espèce *Chondrostoma n. nasus* (introduite en 1860). Pour en étudier les conséquences génétiques, nous avons utilisé sept populations de *C. t. toxostoma*, six populations de *C. n. nasus* et deux zones hybrides, représentant 568 spécimens. Nous avons utilisé quatre caractères méristiques, 18 loci enzymatiques et 500 pb du gène mitochondrial cytochrome b. Nous démontrons l'absence de barrière reproductive entre les deux espèces de chondrostomes, la capacité introgressive de leur génome tant au niveau mitochondrial que nucléaire et la survie des individus hybrides. La combinaison de ces trois différents marqueurs constitue un outil puissant dans la détection des différents niveaux d'hybridation. Cette étude est la première à tenir compte de l'hybridation afin de protéger et de conserver l'espèce endémique *Chondrostoma t. toxostoma*.

ABSTRACT. - Study of introgressive hybridization between *Chondrostoma t. toxostoma* and *Chondrostoma n. nasus* (Teleostei, Cyprinidae) using multiple approaches.

Introduction of invasive species and destruction of natural habitats are the primary factors responsible for teleost extinctions during the last century. Species introductions represent a threat to the survival of native species, and this phenomenon is exacerbated by hybridization and introgression. It was the case for a native species *Chondrostoma t. toxostoma*, which hybridizes with the alien species *Chondrostoma n. nasus* (introduced in 1860). To study the genetic consequences of this introduction, we use seven populations of *C. t. toxostoma*, six populations of *C. n. nasus*, and two hybrid zones for a total of 568 specimens. We used four meristic characters, 18 enzymatic loci, and 500 bp of the mtDNA cytochrome b sequence. We demonstrate the absence of a reproductive barrier between these two species of chondrostomes, their introgressive capacity at the nuclear and mitochondrial level, and survival of hybrids. Use of these three different markers was a powerful tool to detect different levels of hybridization. This study is the first to address the importance of considering hybridization in efforts to ensure protection and conservation of the endemic species *Chondrostoma t. toxostoma*.

Key words. - Cyprinidae - *Chondrostoma* - France - Hybrid area - Invasive species - Native species - Allozyme morphology - Mitochondrial DNA.

L'accroissement de la pression anthropique sur les écosystèmes aquatiques a entraîné l'extinction de nombreuses espèces de Téléostéens au cours du siècle dernier (Crivelli, 1995 ; Elvira et Almodovar, 2001), notamment suite à l'introduction d'espèces envahissantes (Moyle et Light, 1996 ; Claudi et Leach, 1999). Or, l'augmentation croissante des voies de communications fluviales, ajoutée aux nombreux "déversements sauvages" ont favorisé l'introduction d'espèces "étrangères" dans des habitats "naturels" déjà profondément perturbés (Keith : 23-35, in Keith et Allardi, 2001), mettant ainsi en jeu l'intégrité génétique et la survie des espèces endémiques (Bruton, 1995 ; Moyle, 1997 ; Gido et Brown, 1999). En effet, ces introductions créent des zones

de contact, qui, dans certains cas, conduisent à la formation de zones hybrides entre les espèces (Arnold, 1992 ; Dowling et Secor, 1997). Ces zones sont souvent comparées à des laboratoires naturels puisqu'elles peuvent nous renseigner sur les différences entre les espèces et sur la façon dont la sélection affecte, à différents niveaux, le phénomène adaptatif (Arnold, 1992 ; Gerber *et al.*, 2001). Toutefois, l'hybridation peut se révéler problématique pour des espèces endémiques représentées uniquement par de petites populations fragmentées. De plus, même si les phénomènes d'hybridation sont généralement bien connus chez les Téléostéens (Hubbs, 1955 ; Verspoor et Hammar, 1991 ; Bernatchez *et al.*, 1995 ; Wilson et Bernatchez, 1998) et notamment chez

(1) Laboratoire d'Hydrobiologie, EA Biodiversité 2202, Case 36, Université de Provence, 3 place Victor Hugo, 13331 Marseille cedex 3, FRANCE. [costedoa@up.univ-mrs.fr]

(2) Laboratoire Environnement Aquatique, ENSAT, 1 av de l'Agrobiopôle. BP 107 Auzeville Tolosan, 31326 Castanet-Tolosan, FRANCE.

les Cyprinidae (Dowling et DeMarais, 1993 ; Crespin *et al.*, 1999 ; Chenuil *et al.*, 2000 ; Gilles *et al.*, 1998a,1998b, 2001), l'importance des processus d'hybridation et d'introgression est toujours sous-estimée par les biologistes de la conservation (Rhymer et Simberloff, 1996 ; Allendorf *et al.*, 2001).

Les problèmes d'identification sur le terrain (notamment dans la Durance) entre *Chondrostoma toxostoma toxostoma* (Vallot, 1836), endémique du Sud de la France, et *Chondrostoma nasus nasus* (Linneaus, 1758) introduite en France au milieu du XIX^e siècle, nous ont conduits à analyser la zone de contact entre ces deux espèces. Le genre *Chondrostoma* est présent en Asie Mineure, dans le Caucase (Asie du Nord-Ouest) et en Mésopotamie ainsi que dans la majeure partie de l'Europe (Europe de l'Ouest, centrale, Est et pourtour méditerranéen) à l'exception des pays du Nord, de l'Atlantique à la mer Caspienne et de la mer Méditerranée à la mer du Nord et à la Baltique. Plus de 23 formes de chondrostomes sont décrites dans la littérature (voir Durand *et al.*, 2003) or, l'espèce *C. t. toxostoma* y est rarement mentionnée, probablement à cause de sa ressemblance avec d'autres espèces de Cyprinidae, telles que *Leuciscus leuciscus* et *Telestes souffia* (Nelva-Pasqual, 1988). On sait néanmoins que *C. t. toxostoma* vivait à l'origine dans les affluents des grands fleuves. A partir de 1860, l'introduction de *C. n. nasus* (Nelva-Pasqual, 1985), liée à la construction des canaux reliant les bassins du Rhin et du Rhône, a été mis en évidence pour la première fois dans la Saône (Changeux et Pont, 1995) avant de se généraliser. L'accroissement récent de l'altération, voire de la destruction de leurs habitats, ajouté à de nombreuses pêches de destruction, a provoqué le déclin des deux espèces, inscrites désormais en annexe III de la convention de Berne. *C. n. nasus* fait l'objet de mesures spéciales de protection en Suisse (Zbinden et Maier, 1996) alors que *C. t. toxostoma*, inscrite en annexe II de la Directive Faune-Flore-Habitat (Natura 2000), est une espèce pour laquelle on doit impérativement désigner des zones de conservation. L'objectif de cette étude était d'identifier les individus présents dans les zones en sympatrie entre *C. t. toxostoma* et *C. n. nasus*. Pour cela, nous avons utilisé une approche multiple, en caractérisant tout d'abord chacune des deux espèces dans leur zones en allopatry par des marqueurs méristiques et génétiques (systèmes allozymiques et ADN mitochondrial). Une fois la discrimination entre ces deux espèces possible, nous avons utilisé ces marqueurs pour analyser les individus présents dans les zones en sympatrie. Cela nous a permis de démontrer : 1) l'absence de barrière reproductive entre ces deux espèces de chondrostomes, 2) l'existence de potentialités d'introgression au sein de leurs génomes nucléaire et mitochondrial et, 3) la survie d'hybrides.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Échantillonnage

L'échantillonnage des deux chondrostomes a été effectué par pêche électrique en 1996 dans des zones en allopatry, en



Figure 1. - Stations d'échantillonnage des zones en allopatry et parapatry pour *C. n. nasus* (cercles noirs) et pour *C. t. toxostoma* (cercles blancs) et des populations en sympatrie (cercles gris). [Sample stations in allopatry and parapatry for *C. n. nasus* (black circles) and *C. t. toxostoma* (white circles) and for sympatric populations (grey circles).]

Tableau I. - Identification des lieux d'échantillonnage et taille des échantillons pour les données allozymiques, méristiques et d'ADNmt. * Seuls deux caractères méristiques ont été étudiés (rayons des nageoires anale et dorsale) pour la population de Bollène, nous ne l'avons donc pas utilisé dans l'analyse discriminante. ** Toutes les séquences sont *C. n. nasus*. [Locality names of the sampled populations and sample sizes for allozyme, meristic and mtDNA data. * Only two meristic characters were analysed (anal and dorsal fin rays) for bollene population, so we did not use this population in the discriminant analysis. ** All sequences are *C. n. nasus*.]

Localité	Taille des échantillons			Espèce
	Allozymique	Méristique	ADNmt	
Roumanie	24	24	5	<i>C. n. nasus</i>
Allier	26	27	5	<i>C. n. nasus</i>
Chée	30	30	4	<i>C. n. nasus</i>
Usses	34	32	5	<i>C. n. nasus</i>
Bollène	35	35*	9**	<i>C. n. nasus</i>
Flet	32	30	9	<i>C. n. nasus</i>
Lot	29	29	5	<i>C. t. toxostoma</i>
Serre-Ponçon	28	28	13	<i>C. t. toxostoma</i>
Nive	34	34	9	<i>C. t. toxostoma</i>
Garonne	38	38	10	<i>C. t. toxostoma</i>
Doubs	30	30	10	<i>C. t. toxostoma</i>
Adour	28	28	10	<i>C. t. toxostoma</i>
Vidourle	33	32	9	<i>C. t. toxostoma</i>
Ardèche	35	32	11	Zone
Durance	132	133	58	hybride
Total	568	562	172	

parapatric et en sympatric (à cette date les deux espèces n'étaient pas encore répertoriées par la convention de Berne). Les spécimens capturés, ont ensuite été stockés à -80°C. (Fig. 1 ; Tab. I).

Sept populations de *C. t. toxostoma* ont été échantillonnées dans les bassins du Rhône, de la Garonne, et dans la Nive (rivière côtière), ce qui a permis de couvrir l'ensemble de son aire de répartition. Parmi ces populations, cinq sont allopatriques (le Lot, la Nive, la Garonne, l'Adour et le Vidourle) et deux sont des zones en parapatric (Serre-Ponçon et le Doubs). Six populations de *C. n. nasus* ont été échantillonnées, deux populations en allopatric (Chée et Flet), trois populations en parapatric (Allier, Usses et Bollène) et une vient de Roumanie (i.e., de l'aire d'origine de *C. n. nasus*) (Fig. 1 ; Tab. I).

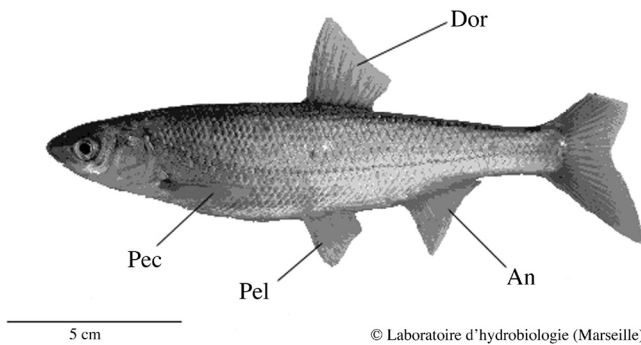


Figure 2. - Représentation des caractères méristiques étudiés sur une photographie de *C. t. toxostoma*. Dor : nageoire dorsale, Pec : nageoire pectorale, Pel : nageoire pelvienne et An : nageoire anale. [Presentation of the meristic characters studied on a *C. t. toxostoma* picture. Dor: dorsal fin, Pec: pectoral fin, Pel: pelvic fin and An: anal fin.]

Identification morphologique

L'importance de l'étude des caractères méristiques dans la compréhension des phénomènes d'hybridation a été clairement démontrée chez les Téléostéens (Verspoor et Hammar, 1991; Ward et Elliot, 1993) et plus particulièrement chez les Cyprinidae (Spillmann, 1961 ; Dowling et DeMara, 1993). Nous avons donc analysé deux caractères axiaux (i.e. les rayons des nageoires anale et dorsale) et deux caractères bilatéraux (i.e. les rayons des nageoires pectorales et pelviennes) pour tous les individus (Fig. 2). L'analyse statistique des données méristiques, établie avec le logiciel S-PLUS (Statistical Sciences, 2000), est basée sur une analyse discriminante dont le but est de déterminer si les variations morphologiques permettent la distinction des deux espèces. Cette méthode recherche la combinaison linéaire des variables qui sépare au mieux les groupes. Cette combinaison linéaire correspond à l'axe discriminant. Chaque individu est ensuite caractérisé par ses coordonnées sur cet axe. Afin de ne pas prendre en compte le bruit induit par l'hybridation, les deux espèces ont été initialement caractérisées à partir de l'ensemble des populations en allopatric à l'exclusion de celles de Flet, Serre-Ponçon et du Vidourle en raison de traces d'hybridation avec d'autres cyprinidae tels que *Leuciscus cephalus*, *Telestes souffia* ou *Rutilus rutilus* (Gilles, 1998). Nous avons ensuite ajouté à l'analyse discriminante les individus des zones parapatriques et sympatriques.

Analyse allozymique

Dix-huit loci enzymatiques ont été analysés par électrophorèse (représentant 15 systèmes) selon le protocole établi par Gilles *et al.* (1996, 1998a) (Tab. II).

Les estimations de la fréquences des allèles ainsi que les différents paramètres de la variabilité génétique (Hétéro-

Enzyme	Numéro Enzyme	Locus	Nombre d'allèles	Solution tampon
Aspartate transaminase	2.6.1.1	sAAT-A	2	A
	2.6.1.1	mAAT-B	2	
Adenylate kinase	2.7.4.3	AK	1	B
Creatine kinase	2.7.3.2	CK-A	1	B
Fructose-bisphosphatase	3.1.3.11	FBP	1	B
Fumarate hydratase	4.2.1.2	FH	1	B
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1.1.1.8	G3PDH	1	B
Glucose-6-phosphate isomerase	5.3.1.9	GPI-A	3	A
	5.3.1.9	GPI-B	3	
3-hydroxybutirate dehydrogenase	1.1.1.30	HBDH	1	B
Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42	mIDHP	1	B
L-lactate dehydrogenase	1.1.1.27	LDH-A	2	A
	1.1.1.27	LDH-B	1	
Malate dehydrogenase	1.1.1.37	sMDH	1	B
Malic enzyme	1.1.1.38	ME	1	B
Mannose-6-phosphate isomerase	5.3.1.8	MPI	3	B
Phosphogluconate dehydrogenase	1.1.1.44	PGDH	3	A
Phosphoglucomutase	5.4.2.2	PGM	2	A

Tableau II. - Nomenclature enzymatique (Shaklee *et al.*, 1990) et solution tampon utilisée : A : Tris-Glycine pH 8,5 ; B : Tris-Citrate pH 6 (Richardson *et al.*, 1986). [Enzyme nomenclature (Shaklee *et al.*, 1990) and buffer used: A: Tris-Glycine pH 8,5 ; B: Tris-Citrate pH 6 (Richardson *et al.*, 1986).]

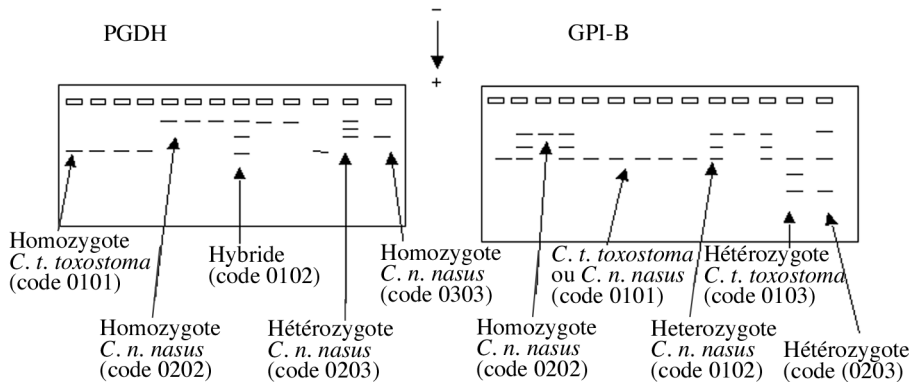


Figure 3. - Différents types de migration rencontrés dans notre étude pour les deux loci nous permettant de discriminer les deux espèces (PGDH et GPI-B). [Different patterns of migration encountered in our study for the two loci (PGDH and GPI-B), which permit to discriminate the two species. Each allozyme genotype was coded (number in parentheses).]

zygotie Hobs, Hn.b et le Polymorphisme P) des populations en allopatrie et en parapatric sont effectués à l’aide des logiciels BIOSYS-1 (Swofford et Selander, 1981) et GENETIX (Belkhir *et al.*, 1996-2002). La différenciation génétique entre les populations a été étudiée en estimant les statistiques F (Wright, 1965) f, θ, F (Weir et Cockerham, 1984 ; Weir et Hill, 2002) sur les 18 loci enzymatiques, en utilisant le programme GENETIX (Belkhir *et al.*, 1996-2002). La méthode de rééchantillonnage par bootstrap a été utilisée afin d’obtenir un intervalle de confiance de 95%. Les fréquences alléliques sont utilisées pour construire un phénogramme basé sur la distance génétique de Cavalli-Sforza et Edward’s (1967) via les algorithmes de regroupement UPGMA et Neighbour-Joining sur 100 jeux de données bootstrappées, en utilisant le logiciel et PHYLIP (Felsenstein, 1995). Deux systèmes ont été ensuite privilégiés pour l’analyse des zones en sympatrie en raison de leur pouvoir de discrimination spécifique : la PGDH et GPI-B sont donc utilisées pour analyser les zones de parapatric. En effet, la PGDH présente des différences de mobilité électrophorétique qui discriminent totalement *C. t. toxostoma* et *C. n. nasus* alors que la GPI-B est semi-diagnostique (Fig. 3). Les différents génotypes allozymiques pour les deux systèmes sont alors codés permettant ainsi de définir chaque individu. Cependant, comme il existe pour chacune des espèces plusieurs profils de migration (plusieurs codes), une “échelle allozymique” représentant tous les types de migration rencontrés dans notre étude a été élaborée. Les valeurs de l’échelle s’échelonnent de 1 à -1. Tous les types électrophorétiques des populations de *C. n. nasus* en allopatric sont définis par 1 et tous ceux des populations allopatric de *C. t. toxostoma* par -1. Les valeurs intermédiaires (0,5 ; 0 ; -0,5) correspondent aux individus hybrides ou introgressés (Tab. III).

Caractérisation de l’ADNmt

L’ADN total a été extrait à partir de tissu musculaire par la méthode phénol-chloroforme. Un fragment de 700 pb du génome mitochondrial, correspondant au cytochrome b, a été amplifié selon la méthode standard de PCR (Polymerase

Chain Reaction) pour 163 individus des deux espèces. Les deux amorces utilisées sont issues de Gerber *et al.* (2001). Les cycles d’amplifications sont effectués à partir de 50 µl de solution de réaction comprenant une unité de DNA polymérase (Bioprobe®), 5 µl de tampon de réaction (Bioprobe®), 0,4 µl de dNTP (100 µM), et 2,5 µl de chaque

Tableau III. - Définition des codes allozymiques pour la GPDH et la GPI-B et présentation de l’échelle allozymique. * Selon l’origine de l’allèle commun pour le locus semi-diagnostique (GPI-B). [Signification of allozymic codes for the PGDH and GPI-B and allozymic scale. * Depending on the origin of the common allele for the semi-diagnostic locus GPI-B].

Code de la PGDH	Code de la GPI-B	Identification	Echelle allozymique
0101	0103	<i>C. t. toxostoma</i>	-1
0101	0101	<i>C. t. toxostoma</i> (ou introgressé)	-0,5
0101	0102	Introgressé <i>C. t. toxostoma</i>	
0101	0202 0203	Introgressé <i>C. t. toxostoma</i> ou introgressé <i>C. n. nasus</i>	
0102	0103	Hybride ou introgressé	0
0102	0101		
0102	0102 0202		
0202	0103 0203*	Introgressé <i>C. n. nasus</i>	+0,5
0202 0203 0303	0101	<i>C. n. nasus</i> (ou introgressé)	+1
0202 0203 0303	0102 0202	<i>C. n. nasus</i>	

amorce (10 μ M). Un microlitre d'ADN est ajouté à cette solution. Les paramètres des cycles sont : 2 min à 92°C (1 cycle) ; 15 s à 92°C ; 45 s à 48°C ; 2 min à 72°C (5 cycles) ; 15 s à 92°C ; 45 s à 52°C ; 2 min à 72°C (30 cycles) et 7 min à 72°C (1 cycle). 500 pb ont été séquencées (brin lourd) par Genome Express®.

Analyse combinée

Les résultats des différents jeux de données ont été combinés graphiquement. L'analyse discriminante des données méristiques est reportée sur l'axe des abscisses et l'échelle des allozymes sur l'axe des ordonnées. Ces deux axes (représentant l'indépendance des marqueurs méristiques et enzymatiques) permettent la discrimination des individus dans différents groupes. Nous avons utilisé l'ADNmt pour identifier la part maternelle impliquée dans la production d'hybrides F1 et d'individus introgressés dans les populations en sympatrie de *C. t. toxostoma* et de *C. n. nasus*. Chaque individu de la zone en sympatrie est identifié comme *C. n. nasus*, *C. t. toxostoma*, hybride F1 ou introgressé, sur la base des données méristiques et allozymiques (en référence aux individus des zones allopatriques) et par l'ADNmt.

RÉSULTATS

Zones allopatriques et parapatriques

Caractères méristiques

L'analyse factorielle discriminante des données méristiques des populations en allopatrie permet une différenciation morphologique entre les deux espèces. En effet, tous les *C. t. toxostoma* (129) sont bien identifiés comme tel alors que seul 1 individu sur les 54 *C. n. nasus* en allopatrie est mal classé. Cet individu présente un nombre anormal de rayons à la nageoire dorsale. Ainsi 99,45% des individus sont bien classés. Trois des quatre variables méristiques contribuent significativement à la définition de l'axe discriminant. Les rayons de la nageoire dorsale participent à hauteur de 35,9% à l'interprétation de l'axe, les rayons de la nageoire pelvienne à 35,8% et ceux de la nageoire pectorale à 27,2%. Les rayons de la nageoire anale (1,1%) ne permettent pas une discrimination entre les deux espèces (Fig. 2). Les données méristiques permettent donc d'obtenir deux groupes, correspondant aux deux espèces. Cependant, la frontière de discrimination entre les deux espèces à partir des données morphologiques étant très étroite, il est difficile d'identifier uniquement par ce marqueur des morphologies intermédiaires. En effet, si on regarde la diagnose des deux espèces sur ces quatre caractères méristiques, on constate un chevauchement fréquent des valeurs. Respectivement pour *C. t. toxostoma* et *C. n. nasus* (X/Y), le nombre de rayons à la nageoire dorsale est majoritairement de 9/10, de 8/9 pour la nageoire pelvienne,

de 15 à 16/16 à 18 pour la nageoire pectorale et de 11/11 à 12 pour la nageoire anale. Nous avons donc plus de chance de trouver un hybride F1 dans la gamme morphologique des parents.

Analyses électrophorétiques

Sept loci enzymatiques sur les dix-huit étudiés sont polymorphes dans les populations en allopatrie et en parapatrie (MPI, sAAT-A, mAAT-B, GPI-A, GPI-B, PGDH, PGM) (Tab. IV). Le coefficient cophénéétique de corrélation est de 0,998. La distance de 0,104 (valeur de bootstrap 90%) indique une grande différenciation génétique entre les deux espèces (Fig. 4).

Parmi les populations de *C. n. nasus*, seul le groupe constitué par les populations des Usses, de Bollène et de l'Allier est significatif. En effet ces trois populations sont

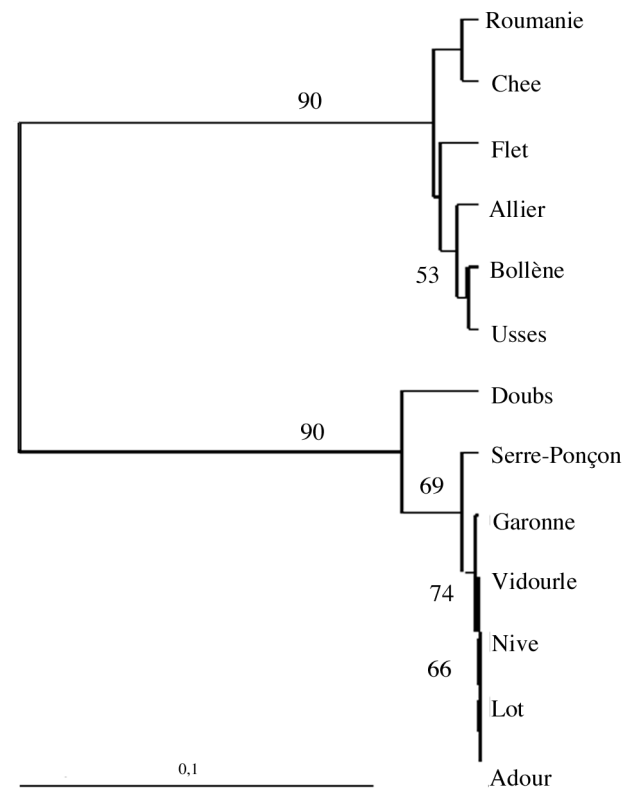


Figure 4. - Phénogramme basé sur la distance de Cavalli-Sforza et Edwards (1967), utilisant l'algorithme de regroupement UPGMA sur 100 jeux de données bootstrappées, basé sur les sept loci polymorphes des populations "pures" de *C. n. nasus* (Roumanie, Chee, Flet, Allier, Bollène et Usses) et *C. t. toxostoma* (Doubs, Serre-Ponçon, Garonne, Vidourle, Nive, Lot et Adour). Le coefficient cophénéétique de corrélation est de 0,998. [Phenogram based on Cavalli-Sforza and Edwards' distance (1967) using the UPGMA clustering algorithm on 100 bootstrapped data sets using the only 7 polymorphic loci of the "pure" populations of *C. n. nasus* (Romania, Chee, Flet, Allier, Bollène and Usses rivers) and *C. t. toxostoma* (Doubs, Serre-Ponçon, Garonne, Vidourle, Nive, Lot and Adour rivers). The co-phenetic coefficient of correlation was 0.998.]

Tableau IV. - Fréquences alléliques pour les 18 loci enzymatiques étudiés pour les populations en allopatrie et en parapatric. Les populations de *C. t. toxostoma* sont en gris. La taille des populations est indiquée entre parenthèses. [Allelic frequencies for the 18 enzymatic loci studied for the parapatric and allopatric populations. *C. t. toxostoma* populations are in grey. Sample size is in parentheses.]

Pop. Locus	Roumanie (24)	Allier (26)	Chée (30)	Usses (34)	Bollène (35)	Flet (32)	Lot (29)	Serre-Ponçon (28)	Nive (34)	Garonne (38)	Doubs (30)	Adour (28)	Vidourle (33)
MPI													
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,982	1,000	1,000	0,967	1,000	1,000
2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000
3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FH													
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
sAAT-A													
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,982	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
mAAT-B													
1	0,979	1,000	1,000	1,000	0,986	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
2	0,021	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
LDH-A													
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
LDH-B													
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
HBDH													
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
G3PDH													
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
mIDHP													
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
GPI-A													
1	1,000	0,827	0,983	0,941	0,900	0,969	1,000	1,000	1,000	0,937	0,800	1,000	1,000
2	0,000	0,173	0,017	0,059	0,100	0,031	0,000	0,000	0,000	0,013	0,200	0,000	0,000
GPI-B													
1	0,604	0,635	0,483	0,853	0,757	0,703	1,000	1,000	1,000	1,000	0,983	1,000	1,000
2	0,396	0,365	0,517	0,147	0,243	0,297	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000
PGDH													
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,922	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,078	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FBP													
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AK													
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CK-A													
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
ME													
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
sMDH													
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
PGM													
1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,982	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

polymorphes pour l'allèle GPI-A (respectivement 0,941, 0,900 et 0,827 ; Tab. IV). La population échantillonnée en Roumanie ne peut pas être distinguée des populations françaises sur la base des données allozymiques. Par ailleurs ces résultats sont similaires avec la méthode du Neighbour-joining. Les populations de *C. n. nasus* présentent un polymorphisme moyen par locus de 12,96% et une hétérozygotie moyenne de 0,032 ± 0,025 (Tab. V). Les populations de *C. t. toxostoma* du bassin du Rhône (Serre-Ponçon et Doubs) sont plus polymorphes (pour les systèmes MPI, GPI-B et PGM) que celles du bassin de la Garonne, de la Nive et du Vidourle, ces dernières étant monomorphes pour tous les systèmes enzymatiques étudiés. Nous observons ainsi une différenciation entre ces deux bassins.

Si nous comparons le pourcentage de loci polymorphes pour les deux chondrostomes, nous observons que les populations de *C. t. toxostoma* sont moins polymorphes (5,57%) que celles de *C. n. nasus* (12,97%) (Tab. V). Des résultats similaires sont observés pour l'hétérozygotie moyenne, ainsi, *C. t. toxostoma* présente une valeur de 0,0044 ± 0,0032 et *C. n. nasus* une valeur de 0,032 ± 0,025. Le Doubs est la seule population polymorphe de *C. t. toxostoma* (16,7%), elle présente une hétérozygotie moyenne de 0,024 ± 0,019, la séparant des autres sur l'arbre UPGMA (Fig. 4). La population de Serre-Ponçon présente 16,7% de loci polymorphes, mais une hétérozygotie moyenne de 0,006 ± 0,003. La différenciation génétique parmi les populations est estimée en calculant le F de Weir et Cockerham pour les sept marqueurs polymorphes. La valeur moyenne de F (0,03026 [0,001491 ; 0,06654]) indique une homogénéité

parmi les populations de *C. n. nasus*. La faible valeur négative de f (-0,03021 [-0,04865; 0,01318]) n'est pas significativement différente de zéro. Ces résultats suggèrent que les populations de *C. n. nasus* sont en équilibre de Hardy-Weinberg. De plus, la valeur moyenne de θ (0,05870 [0,05146 ; 0,06181]) indique que les différentes populations de *C. n. nasus* présentent une différenciation génétique modérée, d'après Hartl et Clark (1997). En outre, la valeur moyenne de θ (0,11837 [0,05792 ; 0,14762]) et de F (0,10314 [0,04615 ; 0,13095]) des échantillons de *C. t. toxostoma* met en évidence un faible degré de différenciation génétique au sein des populations étudiées, mais indique aussi une fragmentation modérée de la population globale due à l'excès d'homozygotes au locus GPI-A ($\theta = 0,30502 \pm 0,15163$; $F = 0,26885 \pm 0,13279$). Ce résultat étant dû à la seule population du Doubs. En effet, en supprimant cette population, nous obtenons un $\theta = 0,00334 \pm 0,00297$ et un $F = -0,00012 \pm 0,00059$. Les valeurs moyennes de f (-0,01728 [-0,02010 ; -0,01125]) indiquent une absence de déficit significatif d'hétérozygotes à l'intérieur des populations de *C. t. toxostoma* échantillonnées. Comme pour *C. n. nasus*, les populations de *C. t. toxostoma* sont en équilibre de Hardy-Weinberg.

Analyses combinées

Le croisement entre l'analyse factorielle discriminante des données méristiques et l'échelle des allozymes permet une discrimination complète des deux espèces (Fig. 5). L'analyse des 94 séquences d'ADNmt confirme cette séparation interspécifique.

	Zone	Population	Pourcentage de loci polymorphes *	Hétérozygotie moyenne**	Hétérozygotie moyenne***
<i>C. n. nasus</i>	Allopatrie	Roumanie	11,1	0,0295 (0,0271)	0,0278 (0,0254)
	Parapatric	Allier	11,1	0,0425 (0,0301)	0,0385 (0,0271)
	Allopatrie	Chée	11,1	0,0301 (0,0282)	0,0333 (0,0314)
	Parapatric	Usses	11,1	0,0204 (0,0151)	0,0229 (0,0172)
	Parapatric	Bollène	16,7	0,0325 (0,0225)	0,0333 (0,0228)
	Allopatrie	Flet	16,7	0,0351 (0,0244)	0,0382 (0,0296)
<i>C. t. toxostoma</i>	Allopatrie	Lot	0	0 (0)	0 (0)
	Parapatric	Serre-Ponçon	16,7	0,0060 (0,0032)	0,0060 (0,0032)
	Allopatrie	Nive	0	0 (0)	0 (0)
	Allopatrie	Garonne	5,6	0,0015 (0,0015)	0,0015 (0,0015)
	Parapatric	Doubs	16,7	0,0236 (0,0182)	0,0241 (0,0186)
	Allopatrie	Adour	0	0 (0)	0 (0)
	Allopatrie	Vidourle	0	0 (0)	0 (0)

Tableau V. - Pourcentage de loci polymorphes et hétérozygotie moyenne pour les populations en allopatric et parapatric de *C. n. nasus* et *C. t. toxostoma*. Les écart-types sont entre parenthèses. * Un locus est considéré polymorphe si plus d'un allèle est détecté. ** H n.b. (Nei, 1978). *** H observée. [Percentage of polymorphic loci and mean heterozygosity for allopatric and parapatric populations of *C. n. nasus* and *C. t. toxostoma*. Standard deviations are in parentheses.]

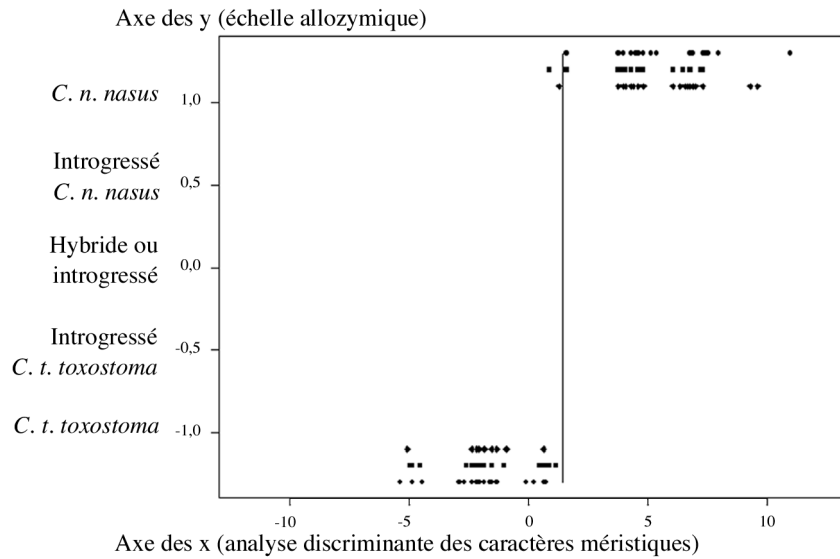


Figure 5. - Combinaison entre l'analyse discriminante des données méristiques (sur l'axe des x) et des données allozymiques (échelle des allozymes, sur l'axe des y) pour les populations en allopatrie et en parapatrie. Les individus *Chondrostoma t. toxostoma* sont proches de l'origine de l'axe des abscisses (tous les individus sont codés -1 sur l'échelle des allozymes). Les individus *C. n. nasus* sont à la position opposée, ils sont tous codés 1 sur l'échelle des allozymes (axe des y). Les cercles : correspondent aux populations en allopatrie, les carrés correspondent aux groupes particuliers (la population de Flet pour *C. n. nasus*, celles du Vidourle et de Serre-Ponçon pour les populations de *C. t. toxostoma*), les losanges correspondent aux populations en parapatrie. [Combinaison between the discriminant analysis of meristic data on the x-axis and the allozyme data (allozymic scale) on the y-axis for the allopatric and parapatric populations. *C. t. toxostoma* specimens are close to the origin on the x-axis (all the individuals were coded -1 on the allozymic scale). *C. n. nasus* specimens are at the opposite position, they were all coded 1 on the allozymic scale (y-axis). Circles: corresponded to allopatric populations, squares: corresponded to particular groups (Flet for *C. n. nasus* population, Vidourle and Serre-Ponçon for *C. t. toxostoma* populations), diamonds: corresponded at parapatric populations.]

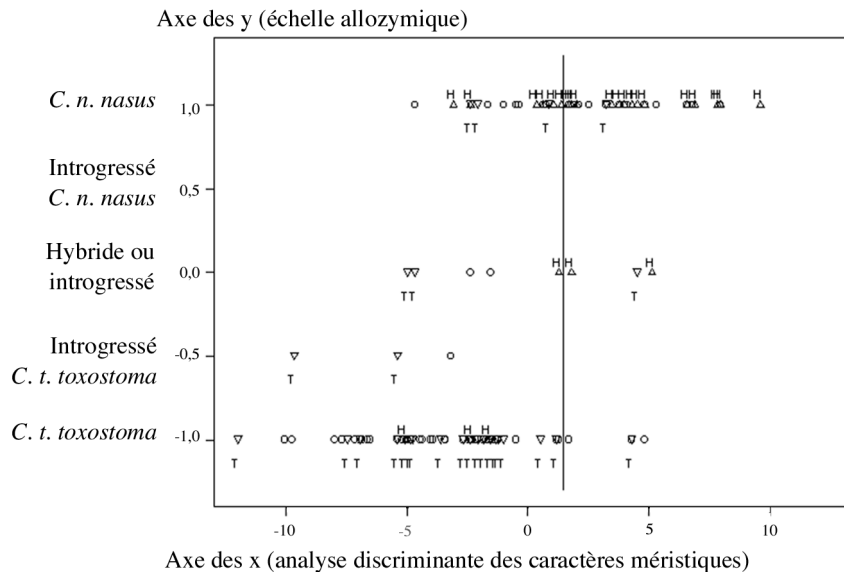


Figure 6. - Localisation des individus de la zone en sympatrie (rivières de l'Ardèche et de la Durance) sur l'axe des x défini par l'analyse discriminante (basée sur les populations en allopatrie) et sur l'échelle des allozymes (cf Tab. II). Les triangles avec la pointe en haut et une lettre H représentent les séquences d'ADNmt *C. n. nasus*, ceux avec la pointe vers le bas et la lettre T représentent les séquences d'ADNmt *C. t. toxostoma*. Les cercles correspondent aux individus pour lesquels nous n'avons pas analysé les séquences d'ADNmt. [Location of the sympatric zone specimens (Ardeche and Durance rivers) on the x-axis defined by the discriminant analysis (based on allopatric populations) and on the allozymic scale (cf. codes Tab. II). Triangles with edge above and letter H represent mtDNA sequences *C. n. nasus*, triangles with edge below and letter T represent mtDNA sequences *C. t. toxostoma*. Circles correspond to the specimens for which we do not studied mtDNA sequences.]

Zone en sympatrie

Caractères méristiques

Nous avons classé les individus de la zone en sympatrie sur l'axe défini par l'analyse factorielle discriminante des populations en allopatrie (Fig. 6). L'analyse discriminante sépare les individus de *C. t. toxostoma* et de *C. n. nasus*, mais il apparaît un groupe intermédiaire qui présente des combinaisons morphologiques jamais observées dans les zones en allopatrie et en parapatrie. Ceci permet l'identification d'individus hybrides et d'individus situés au-delà du nuage de points définissant les individus des espèces "pures" (i.e., des "super"-*C. t. toxostoma* ou des "super"-*C. n. nasus*). Ces "super"-spécimens sont définis à cause de leur positionnement extrême sur l'axe (du côté opposé de la zone de recouvrement).

Analyse électrophorétique

Les résultats enzymatiques des individus de la zone de contact entre les deux espèces révèlent de nouvelles combinaisons alléliques (0,5 ; 0 et -0,5 sur l'échelle des allozymes) correspondant au groupe hybride intermédiaire entre les deux parents.

Marqueurs allozymiques, méristiques et ADNmt

Le croisement entre l'analyse discriminante des données méristiques (axe des x) et de l'échelle des allozymes (axe des y) met en évidence la présence d'individus codés 0 et -0,5 sur l'axe des allozymes identifiés comme hybrides ou introgressés pour les systèmes PGDH et GPI-B (Figs 2, 6). Ces individus présentent une morphologie qui s'échelonne entre celle de *C. t. toxostoma* et celle de *C. n. nasus* (à l'exception des positions extrêmes correspondant aux "super-spécimens"). L'absence d'introgressés *C. n. nasus* (0,5 sur l'échelle des allozymes) peut s'expliquer par la rareté de l'allèle rapide (fréquence = 0,017) sur le locus GPI-B. La direction et l'étendue de l'introgression ont été estimées pour les données allozymiques et l'ADNmt. En effet, les données allozymiques nous ont permis de mettre en évidence le phénomène d'introgression entre *C. t. toxostoma* et *C. n. nasus*, mais c'est la présence d'ADNmt *C. t. toxostoma* et *C. n. nasus* dans le groupe hybride qui indique que l'introgression est bi-directionnelle. En effet, nous avons trouvé des séquences d'ADNmt *C. n. nasus* parmi le groupe défini par la morphologie et les allozymes comme étant des individus *C. t. toxostoma*. Ce résultat est identique pour les séquences d'ADNmt de *C. t. toxostoma*. Ainsi, en combinant les résultats obtenus avec les trois marqueurs dans la zone en sympatrie (Durance + Ardèche), nous avons pu identifier 31,70% individus introgressés chez l'espèce *C. t. toxostoma* et 41,38% chez l'espèce *C. n. nasus*.

DISCUSSION

La distribution géographique actuelle et la parfaite discrimination de ces deux entités taxinomiques par l'utilisation de marqueurs méristiques et moléculaires (allozyme et ADN mitochondrial) confirment le rang spécifique de ces deux chondrostomes en accord avec le principe de concordance généalogique de Avise et Ball (1990). En effet, la distance allozymique entre les deux espèces (0,104), la monophylie réciproque de ces deux espèces, supportée par de fortes valeurs de bootstrap (Bp = 90), et le pourcentage de divergence moléculaire (7%) portant sur les séquences de cytochrome b (Gilles *et al.*, 1998a) indiquent clairement que *C. t. toxostoma* et *C. n. nasus* sont des espèces valides.

D'une façon générale, les populations de *C. t. toxostoma* sont beaucoup moins polymorphes que les populations de *C. n. nasus* (5,57% de loci polymorphes en moyenne contre 12,97%), elles-mêmes moins polymorphes que *Telestes souffia* (19,21%) (Gilles *et al.*, 1998b). Le polymorphisme observé dans les populations de *C. t. toxostoma* dans la zone en sympatrie ne correspond pas uniquement à la présence d'allèles spécifiques de *C. n. nasus*, mais bien à des allèles propres comme ceux qui ont été identifiés dans la population de la rivière Doubs. En effet, cette population de *C. t. toxostoma* (zone en parapatrie) montre des allèles spécifiques sur le locus de la GPI-B, qui n'ont jamais été observés dans les populations de *C. n. nasus*. L'hétérozygotie de *C. n. nasus* ($0,032 \pm 0,025$) est comparable à celle qui a été trouvée chez les Cyprinidae d'Amérique du Nord, $0,052 \pm 0,004$ (Avise, 1977). *C. t. toxostoma* constitue une espèce quasi monomorphe ($0,004 \pm 0,003$). Cependant, l'isolation géographique des différentes populations de *C. t. toxostoma* a conduit à la rupture du flux génique. De plus, les deux populations polymorphes (Doubs et Serre-Ponçon) ne montrent aucun déficit en hétérozygotes, ce qui suggère l'absence de sélection sur les génotypes hétérozygotes dans ces populations. D'autre part, le polymorphisme observé pour les populations de *C. n. nasus* est similaire à celui rencontré au sein de populations anciennes ayant peu connu de goulot d'étranglement. Ce résultat est surprenant puisque *C. n. nasus* est une espèce récemment introduite. Ce résultat peut être dû, soit à l'introduction d'un très grand nombre d'individus de l'espèce *C. n. nasus*, soit à la multiplication des sources d'introduction. De plus, même si les électrophorèses enzymatiques sont une méthode efficace pour l'analyse du polymorphisme, il est difficile d'extrapoler nos résultats au génome dans son ensemble puisque les allozymes utilisés dans cette étude représentent uniquement un sous-ensemble du génome nucléaire.

Selon la définition de Harrisson (1993), la Durance et l'Ardèche (zones en sympatrie entre *C. n. nasus* et *C. t. toxostoma*) peuvent être définies comme des zones hybrides

en mosaïque, puisqu'elles ne sont pas caractérisées par un simple cline. Notre protocole d'identification des hybrides est forcément biaisé par défaut, puisque des hybrides peuvent apparaître comme des individus *C. t. toxostoma* ou *C. n. nasus* purs sur les trois marqueurs employés. En utilisant trois marqueurs indépendants, nous montrons une sous-estimation de l'introgession dans la zone hybride qui est en partie due à la présence d'individus hybrides dans une des classes parentales (i.e., ces individus présentent des allozymes et des caractères morphologiques d'une espèce et l'ADN mitochondrial de l'autre). Cependant, l'importance du nombre d'individus introgressés présentant une recombinaison génomique semble être un indicateur de l'importance du phénomène d'hybridation comme réponse au stress. La présence d'individus introgressés entre les deux espèces signifie qu'au moins certains hybrides de première génération sont viables et fertiles montrant ainsi l'absence de barrière reproductive entre celles-ci. La présence d'ADNmt *C. t. toxostoma* et *C. n. nasus* parmi les individus hybrides démontre que l'introgession entre *C. t. toxostoma* et *C. n. nasus* est bidirectionnelle. Dans ce cas, une assimilation génétique complète est possible entre les deux chondrostomes et peut présenter un danger pour l'intégrité génétique des espèces parentales (Berrebi *et al.*, 1989 ; Gilles, 1998). Ces marqueurs se sont avérés suffisamment puissants pour identifier les populations introgressées, permettant ainsi de proposer un programme de conservation. Pour le moment, le bassin de la Garonne doit être protégé contre l'introduction de *C. n. nasus*. De même, il est impératif de protéger la population du Doubs qui représente la seule population polymorphe pure du bassin du Rhône. Bien que des spécimens hybrides aient été détectés dans des études précédentes, les marqueurs utilisés dans cette étude indiquent que les populations échantillonnées de Serre-Ponçon et du Vidourle représentent des populations pures de *C. t. toxostoma*. Il semble que des hybridations ponctuelles avec des Cyprinidae autres que *C. n. nasus* se produisent dans ces localités, mais des études plus poussées sont nécessaires avant de conférer un statut de protection à ces populations.

Remerciements. - Ce travail a été en partie réalisé grâce à un financement de la "région PACA". Nous remercions les officiers du "Conseil Supérieur de la Pêche" qui nous ont aidés dans les prélèvements des échantillons. Merci à J. -C. Lumet (délégation régionale Metz), M. Proschaska (Doubs), M. Penelon (Aube), F. Guidoux (Marne), R. Wiacek, (Ardennes), P. Martin Poiblan (Meuse), A. Biselx (Vosges), D. Reininger (Haut Rhin), J. B. Schweyer (Meurthe & Moselle), Walters (Haute Savoie), M. Le Baron (Gard), E. Chuzeville (Vaucluse), P. Moullec (Hte Alpes), M. Niveau (Var), J.P. Dereuder (Alpes de Hte Provence), X. Chaslard (Lot), Maynadier (Tarn), M. Tournadour (Dordogne), B. Lechevilier (Puy de Dômes) et L. Dumeé (Corrèze).

RÉFÉRENCES

- ALLENDORF F. W., LEARY R.F., SPRUELL P. & J.K. WENBURG, 2001. - The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.*, 16(11): 613-622.
- ARNOLD M.L., 1992. - Natural hybridization as an evolutionary process. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 23: 237-261.
- AVISE J.C., 1977. - Genic heterozygosity and rate of speciation. *Conserv. Biol.*, 2: 170-84.
- AVISE J.C. & R.M. BALL, 1990. - Principles of Genealogical Concordance in Species Concepts and Biological Taxonomy. *Oxford Surv. Evol. Biol.*, 7: 45-67.
- BERNATCHEZ L., GLÉMET H., WILSON C.C. & R.G. DANZMANN, 1995. - Introgression and fixation of arctic char (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial genome in an allopatric population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 179-185.
- BERREBI P., DUPONT F., CATTANEO-BERREBI G. & A.J. CRIVELLI, 1989. - An isozyme study of the natural cyprinid hybrid *Alburnus alburnus* x *Rutilus rubilio* in Greece. *J. Fish Biol.*, 34(2): 307-313.
- BELKHIR K., BORSA P., CHIKHI L., RAUFASTE N. & F. BONHOMME, 1996-2002. - GENETIX 4.04, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Univ. Montpellier II (France).
- BRUTON M.N., 1995. - Have fish had their chips? The dilemma of threatened fishes. *Environ. Biol. Fish.*, 15: 243-71.
- CAVALLI-SFORZA L.L. & A.W. EDWARDS, 1967. - Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.*, 19(19): 233.
- CHANGEUX T. & D. PONT, 1995. - Current status of the riverine fishes of the French Mediterranean basin. *Biol. Conserv.*, 72(2): 137-158.
- CHENUIL A., CRESPIN L., POUYAUD L. & P. BERREBI, 2000. - Movements of adult fish in a hybrid zone revealed by microsatellite genetic analysis and capture-recapture data. *Freshw. Biol.*, 43(1): 121-131.
- CLAUDI R. & J. H. LEACH, 1999. - Nonindigenous Freshwater Organism: Vectors, Biology and Impacts. Lewis Publishers. Florida: Boca Raton
- CRESPIN L., BERREBI P. & J.-D. LEBRETON, 1999. - Asymmetrical introgression in a freshwater fish hybrid zone as revealed by a morphological index of hybridization. *Biol. J. Linn. Soc.*, 67(1): 57-72.
- CRIVELLI A.J., 1995. - Are fish introductions a threat to endemic freshwater fishes in the northern Mediterranean region? *Biol. Conserv.*, 72(2): 311-319.
- DOWLING T.E. & B.D. DEMARIS, 1993. - Evolutionary significance of introgressive hybridization in cyprinid fishes. *Nature*, 362: 444-446.
- DOWLING T.E. & C. SECOR, 1997. - The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 28: 593-619. DURAND J.D., BIANCO P.G., LAROCHE J. & A. GILLES, 2003. - Insight into the origin of endemic Mediterranean ichthyofauna: Phylogeography of *Chondrostoma* genus (Teleostei, Cyprinidae). *J. Hered.*, 94(4):315-328

- ELVIRA B. & A. ALMODOVAR, 2001. - Freshwater fish introductions in Spain: facts and figures at the beginning of the 21st century. *J. Fish Biol.*, 59(1): 323-331.
- FELSENSTEIN J., 1995. - PHYLIP - Phylogeny inference package (Version 3.6). *Cladistics*, 5: 164-166.
- GERBER A.S., TIBBETS C.A. & T.E. DOWLING, 2001. - The role of introgressive hybridization in the evolution of the *Gila robusta* complex (Teleostei: Cyprinidae). *Evolution*, 55(10): 2028-2039.
- GIDO K.B. & J.H. BROWN, 1999. - Invasion of North American drainages by alien fish species. *Freshw. Biol.*, 42: 387-399.
- GILLES A., 1998. - Etude du complexe poly-spécifique des Cyprinidae Européens : Systématique, spéciation et zones hybrides. Thèse de Doctorat d'Etat, 174 p. Univ. Provence - Marseille I, France.
- GILLES A., BARASCUD B., BOUCHARD P. & R. CHAPPAZ, 1996. - Study of the variability of *Leuciscus soufia*, cyprinidae fish, by analysis of enzyme polymorphism and meristic characters. *C. R. Acad. Sci. III*, 319(5): 393-399.
- GILLES A., CHAPPAZ R., CAVALLI L., LORTSCHER M. & E. FAURE, 1998a. - Genetic differentiation and introgression between putative subspecies of *Leuciscus soufia* (Teleostei: Cyprinidae) of the region of the Mediterranean Alps. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 55(10): 2341-2354.
- GILLES A., LECOINTRE G., FAURE E., CHAPPAZ R. & G. BRUN, 1998b. - Mitochondrial phylogeny of the European cyprinids: Implications for their systematics, reticulate evolution, and colonization time. *Mol. Phyl. Evol.*, 10(1): 132-143.
- GILLES A., LECOINTRE G., MIQUELIS A., LOERSTCHER M., CHAPPAZ R. & G. BRUN, 2001. - Partial combination applied to phylogeny of European cyprinids using the mitochondrial control region. *Mol. Phyl. Evol.*, 19(1): 22-33.
- HARRISSON R. G., 1993. - Hybrid Zones and the Evolutionary Process. *Principle of Population Genetics*, 3rd edit. Oxford Univ. Press.
- HARTL L.D. & A.G. CLARK, 1997. - *Principles of Population Genetics*. 542 p. 3rd edit. Oxford Univ. Press.
- HUBBS C.L., 1955. - Hybridization between fish species in nature. *Syst. Biol.*, 4: 1-20.
- KEITH P., 2001. - La période historique. In: Atlas des Poissons d'Eau douce de France (Keith P. & J. Allardi, 2001, édés), pp. 23-35-169. Coll. Patrimoines naturels.
- MOYLE P. B., 1997. - The importance of an historical perspective: Fish introductions. *Fisheries*, 22: 14.
- MOYLE P. B. & T. LIGHT, 1996. - Biological invasions of fresh water: Empirical rules and assembly theory. *Biol. Conserv.*, 78(1-2): 149-161.
- NELVA-PASQUAL A., 1985. - Biogéographie, démographie et écologie de *Chondrostoma nasus nasus* (L., 1758) Hotu (Poisson, Téléostéen, Cyprinidé). Thèse de Doctorat d'Etat, 363 p. Univ. Claude-Bernard-Lyon I.
- NELVA-PASQUAL A., 1988. - Origine et biogéographie des deux Chondrostomes Français : *Chondrostoma nasus* et *C. toxostoma* (Pisces, Cyprinidae). *Cybium*, 12: 287-299.
- RHYMER J.M. & D. SIMBERLOFF, 1996. - Extinction by hybridization and introgression. *Annu. Rev. Syst.*, 27: 83-109.
- SPILLMANN J., 1961. - Faune de France : Poissons d'Eau douce. Paris: P. Lechevalier.
- STATISTICAL SCIENCE 2000. - S-Plus programmer's Manual Version SP 2000 Seattle: STATSCI, a division of Mathsoft, Inc.
- SWOFFORD D. & R. SELANDER, 1981. - Biosys-1: A fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.*, 72: 281-283.
- VERSPLOOR E. & J. HAMMAR, 1991. - Introgressive hybridization in fishes: the biochemical evidence. *J. Fish. Biol.*, 39: 309-334.
- WARD R.D. & N.G. ELLIOT, 1993. - Heterozygosity and morphological variability in the orange roughy, *Hoplostethus atlanticus* (Teleostei, Trachichtchidae). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 1641-1693.
- WEIR B. S. & C.C. COCKERHAM, 1984. - Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- WEIR B.S. & W.G. HILL, 2002. - Estimating F-statistics. *Annu. Rev. Genet.*, 36: 721-750.
- WILSON C.C. & L. BERNATCHEZ, 1998. - The ghost of hybrids past: Fixation of arctic charr (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial DNA in an introgressed population of lake trout (*S. namaycush*). *Mol. Ecol.*, 7(1): 127-132.
- WRIGHT S., 1965. - The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395-420.
- ZBINDEN S. & K.J. MAIER, 1996. - Contribution to the knowledge of the distribution and spawning grounds of *Chondrostoma nasus* and *Chondrostoma toxostoma* (Pisces, Cyprinidae) in Switzerland. In: Conservation of endangered Freshwater Fish in Europe (Kirchlofer A. & Hefti D., eds), pp. 287-297. Switzerland: Birkhuser Verlag Baserl.