

Quelles salamandres tachetées trouve-t-on dans le sud-ouest de la France ?

Which fire salamanders inhabit the southwest of France?

Sven GIPPNER⁽¹⁾, Axel HERNANDEZ⁽²⁾, Johanna AMBU⁽³⁾, Vincent DUBUT⁽⁴⁾, Gilles POTTIER⁽⁵⁾,
Audrey TROCHET⁽⁶⁾, Pierre-André CROCHET⁽⁷⁾, Miguel VENCES⁽¹⁾ & Christophe DUFRESNES⁽⁸⁾

⁽¹⁾ Zoologisches Institut, Technische Universität Braunschweig, Mendelssohnstr. 4, 38106 Braunschweig, Germany

⁽²⁾ Department of Environmental Sciences, Faculty of Sciences and Technics, University Pasquale Paoli of Corsica, Corte, 20250, France

⁽³⁾ Laboratory for Amphibian Systematics and Evolutionary Research, College of Ecology and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu, People's Republic of China

⁽⁴⁾ ADENEKO, Saint-Girons, France

⁽⁵⁾ Nature en Occitanie, 14 rue de Tivoli, 31000 Toulouse, France

⁽⁶⁾ Société Herpétologique de France, Muséum national d'Histoire naturelle, 57 Rue Cuvier 75005, CP41 Paris, France

⁽⁷⁾ CEFE, CNRS, Univ Montpellier, EPHE, IRD, Montpellier, France

⁽⁸⁾ Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE-PSL, Université des Antilles, 55 rue Buffon, CP 51, Paris, France

Auteur correspondant : Christophe DUFRESNES – Christophe.Dufresnes@hotmail.fr

Résumé – La systématique et la diversité des populations françaises de Salamandre tachetée (*Salamandra salamandra*) a récemment reçu un regain d'intérêt scientifique, principalement en raison de nouvelles opportunités offertes par les méthodes génétiques pour mieux identifier et définir les taxons. Cet article propose une analyse des données moléculaires issues de deux récentes études afin de clarifier la distribution des sous-espèces de *S. salamandra* supposées dans le sud-ouest de la France. Premièrement, les analyses de milliers de marqueurs génomiques obtenus sur une trentaine d'échantillons par une approche RAD (Restriction Associated DNA) confirment l'existence de deux groupes génétiques très divergents dans les Pyrénées, l'un distribué sur la partie centrale et occidentale du massif, correspondant à *S. s. fastuosa*, l'autre occupant la partie orientale et s'étendant sur le reste de la France. Ce deuxième groupe consiste en trois lignées phylogéographiques distinctes ayant récemment évolué pendant le Pléistocène, l'une correspondant à *S. s. terrestris*, et les deux autres, restreintes aux Pyrénées espagnoles et au massif du Montseny, associées à la controversée *S. s. "hispanica"*, dont des traces génétiques se retrouvent également en France. Deuxièmement, le séquençage d'un fragment d'ADN mitochondrial chez une centaine d'individus Pyrénéens par une approche de minibarcoding (génotypage de marqueurs code-barres) confirme et affine les aires respectives de *S. s. fastuosa* et *S. s. terrestris*/*"hispanica"* dans le sud-ouest français, notamment la présence d'une transition dans les Pyrénées centrales, là où les données RAD suggèrent de l'introgression génétique. Cette synthèse, qui soutient le statut intraspécifique de *S. s. fastuosa* et l'absence de *S. s. "hispanica"* en France, du moins sous sa forme pure, constitue un point de départ pour approfondir les connaissances sur la distribution géographique des sous-espèces de Salamandre tachetée et pour examiner les processus qui régulent le flux de gènes entre elles.

Mots-clés – ADN mitochondrial ; Phylogéographie ; RAD ; *Salamandra salamandra* ; Systématique

Abstract – The taxonomy and diversity of French populations of the fire salamander (*Salamandra salamandra*) have recently regained scientific interest, due to advances in genetic methods that help identify and define taxa. This study reanalyzes molecular data from two recent studies to clarify the distribution of *S. salamandra* subspecies in southwestern France. First, genome-wide RAD sequencing of 30 samples confirms the existence of two highly divergent genetic groups in the Pyrenees: one in the central and western parts, corresponding to *S. s. fastuosa*, and another in the eastern Pyrenees and the rest of France. This second group actually includes three distinct phylogeographic lineages that diverged during the Pleistocene: *S. s. terrestris*, and two others (in the Spanish Pyrenees and Montseny Mountains) linked to the debated *S. s. "hispanica"*, whose genetic traces also appear in France. Second, mitochondrial DNA sequencing of 98 individuals using minibarcoding refines the distribution boundaries of *S. s. fastuosa* and *S. s. terrestris*/*"hispanica"*, particularly identifying a transition zone in the central Pyrenees in the area where

RAD data suggest genetic introgression. The findings support the intraspecific status of *S. s. fastuosa* and suggest that *S. s. "hispanica"* is absent from France in its pure form. This work lays the foundation for better understanding subspecies distributions and gene flow in French *S. salamandra*.

Key-words - mitochondrial DNA; Phylogeography; RAD-sequencing; *Salamandra salamandra*; Systematics

INTRODUCTION

Avec une quinzaine de sous-espèces actuellement reconnues, la Salamandre tachetée *Salamandra salamandra* est l'amphibien présentant la plus grande diversité subspécifique en Europe (Speybroeck *et al.* 2016, Dufresnes 2019, Gippner *et al.* 2024). La systématique et la distribution de plusieurs de ces sous-espèces sont cependant toujours débattues, bien que plusieurs études moléculaires à la résolution de plus en plus précise soient disponibles (Vences *et al.* 2014, Burgon *et al.* 2021, Mulder *et al.* 2022, Gippner *et al.* 2024). D'une part, certains naturalistes considèrent que *S. salamandra* pourrait comprendre jusqu'à six espèces différentes sur la base de leur diversification phylogénétique (Raffaëlli 2020, 2022). Cependant, même les sous-espèces les plus divergentes semblent toujours en mesure de s'hybrider et de mélanger leur génome dès lors qu'elles ont l'opportunité de se rencontrer (Velo-Antón *et al.* 2021), ce qui tend à contredire l'existence de plusieurs espèces au sens « biologique » du terme (Gippner *et al.* 2024). D'autre part, la validité de certaines sous-espèces reste floue, car plutôt que de véritables lignées évolutives, elles pourraient refléter de la structure génétique récente et/ou du métissage avec d'autres sous-espèces. À ce jour, les échantillons étudiés restent trop disparates pour reconstituer l'histoire biogéographique et la distribution exacte de certaines sous-espèces. C'est notamment le cas dans la péninsule des Balkans, mais aussi en France (Gippner *et al.* 2024).

Il est communément admis que les populations de *S. salamandra* du sud-ouest de la France correspondent à deux sous-espèces, à savoir la Salamandre tachetée fastueuse *S. s. fastuosa* dans la partie occidentale des Pyrénées, et la Salamandre tachetée terrestre *S. s. terrestris* dans le reste de la région. Ces sous-espèces sont phylogénétiquement très divergentes : elles appartiennent aux deux clades principaux identifiés chez *S. salamandra*, à savoir le clade A, qui regroupe *S. s. terrestris* avec une grande partie de la diversité de l'espèce en Europe centrale, dans les Balkans, et dans la péninsule Ibérique, et le clade B, limité à *S. s. fastuosa*, sa proche cousine italienne *S. s. gigliolii*, et les populations du nord-ouest espagnol connues sous

le nom de *S. s. bernardezi* et *S. s. alfredschmidti*, ces deux derniers taxons ayant été regroupés (sous *S. s. bernardezi*) il y a une dizaine d'années (Beukema *et al.* 2016 ; Fig. 1). Les limites géographiques respectives de *S. s. fastuosa* et *S. s. terrestris* restent méconnues. L'identification de ces sous-espèces est principalement basée sur le patron de coloration (robe à prédominance jaune pour *S. s. fastuosa* vs. noire avec deux bandes dorsales jaunes chez *S. s. terrestris*), mais celui-ci peut être très variable et donc peu fiable (Speybroeck *et al.* 2016).

Par ailleurs, une troisième sous-espèce pourrait pénétrer en Occitanie depuis la Catalogne : la Salamandre tachetée hispanique *S. s. hispanica* (Raffaëlli 2022). Sa validité reste toutefois controversée. Originellement décrite dans le massif du Montseny en Catalogne espagnole (Wolterstorff 1937), *S. s. hispanica* fut par la suite synonymisée avec d'autres sous-espèces (Eiselt 1958). Plus récemment, certains auteurs ont relevé des différences de coloration entre les salamandres du massif du Montseny et leurs voisines françaises *S. s. terrestris*, les premières rappelant plus *S. s. salamandra* d'Europe de l'Est (Donaire-Barroso *et al.* 2014, Donaire-Barroso & Rivera 2018, Rivera *et al.* 2019). Ainsi, *S. s. hispanica* fut remise au goût du jour (Raffaëlli 2020) et même évoquée dans le cadre de la découverte d'une population dans le sud de la France (Minervois), dont les individus arborent une coloration et une morphologie atypique pour la région (bandes dorsales jaunes interrompues ; aspect trapu, queue courte, museau pointu ; Hernandez & Raffaëlli 2017). Enfin, des analyses génomiques placent les échantillons du Montseny dans un groupe monophylétique distinct (Burgon *et al.* 2021), ce qui tend donc à confirmer la validité de *S. s. hispanica* (Gippner *et al.* 2024 ; Fig. 1). Cependant, ces analyses, conduites à l'échelle du genre *Salamandra* dans son ensemble, n'explicitent pas l'origine de la différentiation génétique observée chez ces populations catalanes, ni l'introgression potentielle avec *S. s. terrestris* et d'autres sous-espèces. Ainsi, la divergence notée entre *S. s. hispanica* et *S. s. terrestris* pourrait être un artefact lié à de l'isolement par la distance, ou encore refléter du flux génique avec d'autres sous-espèces plus distantes.

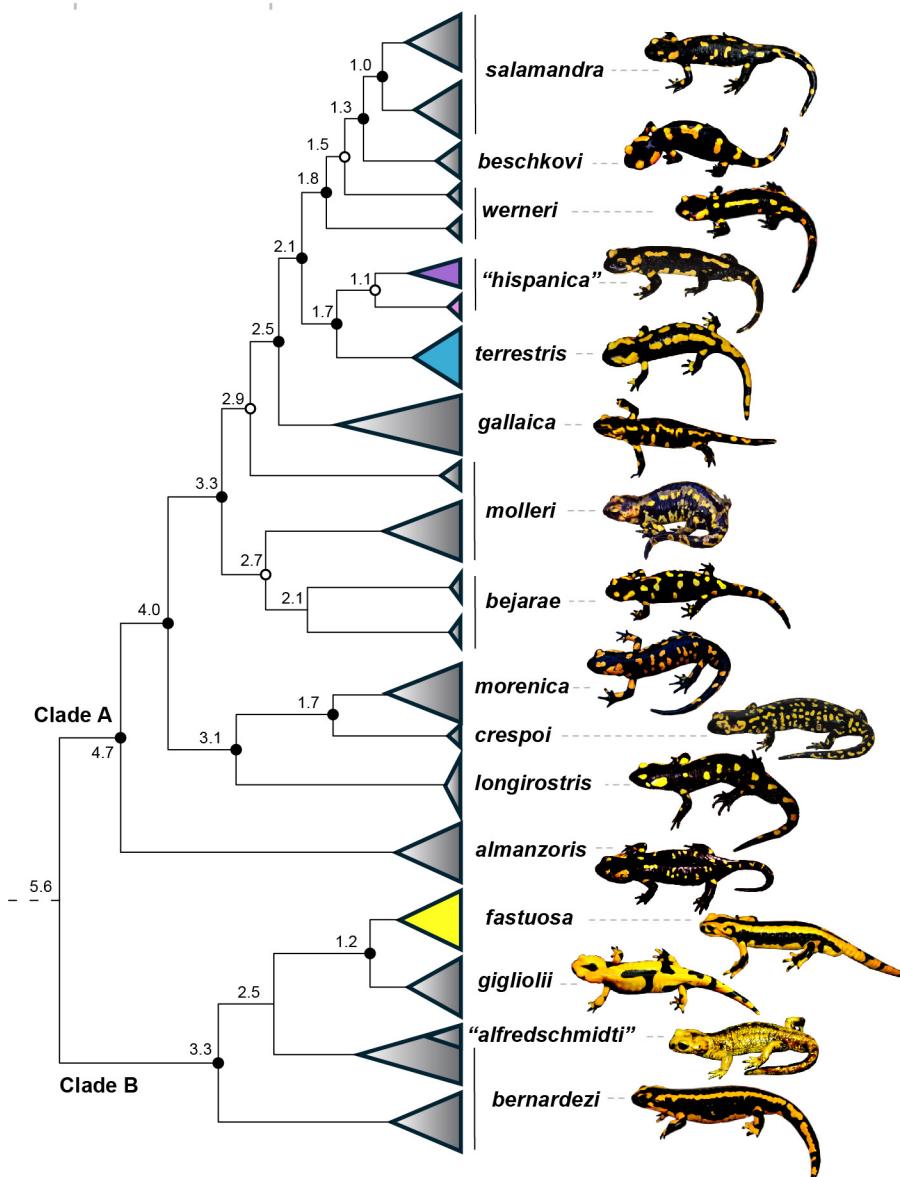


Figure 1 - Phylogénie de *S. salamandra* basée sur l'analyse phylogénomique de marqueurs RAD (835 467 bp) par Gippner et al. (2024). Les sous-espèces discutées dans cet article sont affichées avec des codes-couleurs. Les points indiquent le soutien statistique des branches, soit total (plein) soit élevé (vide, 0.95–0.99 de probabilité). Les valeurs des nœuds correspondent aux temps de divergence estimés en million d'années.

Figure 1 - Phylogeny of *S. salamandra* based on phylogenomic analysis of RAD markers (835 467 bp) by Gippner et al. (2024). The subspecies discussed in this article are shown with color codes. Dots indicate the statistical support of branches, either complete (filled) or high (open, 0.95–0.99 probability). Node values correspond to estimated divergence times in millions of years.

Cet article vise à synthétiser les résultats moléculaires relatifs à la classification et aux aires de répartitions respectives des sous-espèces de Salamandre tachetée qui se trouvent ou pourraient se trouver dans le sud-ouest de la France, obtenus par deux études récemment menées en parallèle. La première étude, réalisée par Gippner et al. (2024), consistait à analyser des milliers de marqueurs génomiques obtenus par méthode RAD (Restriction Associated DNA ;

fragments d'ADN répartis aléatoirement dans le génome) pour retracer la diversification de tout le genre *Salamandra* et tirer des enseignements sur sa systématique intraspécifique, et incluait entre autres des échantillons de France métropolitaine et de Catalogne espagnole. La seconde étude, menée par la Société Herpétologique de France (SHF) en collaboration avec le réseau naturaliste, a permis de génotyper deux marqueurs moléculaires pour une centaine de Salamandre tachetée dans le cadre de la

mise à jour de la répartition des nouvelles espèces d'amphibiens et reptiles présentes en France hexagonale, via une approche de minibarcoding (Trochet et al. 2024 ; séquences « code-barres » au potentiel discriminatoire entre taxons, et de courtes tailles pour séquençage haut-débit).

Nous détaillons et réanalysons ici les données de ces deux études afin : (1) d'affiner les distributions de *S. s. fastuosa* et *S. s. terrestris*, notamment leur zone de contact ; (2) de comprendre l'identité génétique des populations Catalanes pour mieux appréhender la validité de *S. s. hispanica*, et (3) d'établir si cette dernière est présente en France où elle aurait été confondue avec *S. s. terrestris*.

MÉTHODES

Analyses génomiques

Gippner et al. (2024) ont générée des données RAD permettant d'obtenir différents alignements de séquences et matrices de marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism), suivant la méthodologie détaillée dans leur article. Les auteurs sont partis d'un arbre phylogénomique basé sur 356 874 paires de base (base pairs, bp) incluant 392 échantillons représentant la diversité connue du genre *Salamandra*, dont ils ont identifié les principales lignées divergentes. Ils ont ensuite déterminé si les lignées correspondaient à des individus hybrides/métissés plutôt qu'à de véritables groupes génétiques distincts grâce à des assignations bayésiennes réalisées sur différentes séries d'échantillons avec le programme STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). Leur première analyse (voir la figure 2 dans Gippner et al. 2024) distinguait onze groupes génétiques principaux, dont deux présents en France correspondent à *S. salamandra* : (1) un groupe correspondant au clade B de *S. salamandra* (Fig. 1), à savoir *S. s. fastuosa*, *S. s. gigliolii* et *S. s. bernardezi/alfredschmidti* ; (2) un groupe correspondant à *S. s. terrestris*. Dans cette analyse, les échantillons de Catalogne espagnole (donnés comme *S. s. "hispanica"*) et de l'est Pyrénéen présentaient une composition intermédiaire, avec des contributions du groupe génétique de *S. s. terrestris*, d'un groupe génétique du nord-ouest espagnol (correspondant à *S. s. gallaica*), et d'un groupe génétique d'Europe de l'Est (correspondant à *S. s. salamandra*, *S. s. werneri* et *S. s. beschkovi*). Comme élaboré dans Gippner et al. (2024), ce type de signal mixte peut signifier

une origine métissée des échantillons, mais il peut également être un artefact de l'analyse, notamment si le jeu de données couvre différents degrés de structure génétique, et si l'échantillonnage des groupes est trop inégal (ce qui était le cas ici) – un problème connu de STRUCTURE (Toyama et al. 2020). Pour s'en affranchir, il est nécessaire de recibler les analyses uniquement sur les échantillons des groupes en question. Ainsi, une seconde analyse (non détaillée par Gippner et al. 2024) restreinte aux échantillons de *S. s. "hispanica"* et à ceux assignés à *S. s. gallaica*, *S. s. terrestris* et au groupe d'Europe de l'Est, montre une absence de pedigree *S. s. gallaica* en Catalogne et place les *S. s. "hispanica"* dans un groupe génétique distinct, mais toujours avec un signal intermédiaire avec *S. s. terrestris*. Une troisième analyse (également non présentée) limitée aux échantillons de *S. s. "hispanica"* et *S. s. terrestris* distingue deux groupes géographiques en Catalogne espagnole, cette fois sans signal mixte, ni entre eux ni avec *S. s. terrestris*. C'est sur la base des résultats de ces analyses successives que l'arbre phylogénomique final « sans hybride » des auteurs (voir la figure 4 dans Gippner et al. 2024) inclut ces échantillons *S. s. "hispanica"*, les amenant à suggérer la possible validité de cette sous-espèce, étant donné sa divergence par rapport à *S. s. terrestris* et leur monophylie respective (Fig. 1). Quelle que soit sa validité, *S. s. "hispanica"* correspond donc à un groupe génétiquement distinct du nord de la Catalogne espagnole.

Afin d'établir les distributions respectives de *S. s. fastuosa* et *S. s. terrestris*, et de *S. s. terrestris* et *S. s. "hispanica"* en France, nous avons ici repris deux jeux de données utilisés par Gippner et al. (2024). Le premier consiste en 2 786 SNPs génotypés chez 30 échantillons de *S. s. fastuosa* et *S. s. terrestris/"hispanica"*, dont les probabilités d'assignation à deux groupes avaient été calculées avec STRUCTURE ($K = 2$) pour évaluer leur introgression (voir la figure 3A dans Gippner et al. 2024; Table S1). Le second consiste en 4 429 SNPs génotypés chez 11 échantillons de *S. s. terrestris* et *S. s. "hispanica"*, dont les probabilités d'assignation à trois groupes avaient été calculées avec STRUCTURE ($K = 3$) pour vérifier la nature introgressée ou non des échantillons avant inclusion dans la phylogénie (non présenté par Gippner et al. 2024; Table S2). Nous reportons ici ces résultats combinés à des analyses supplémentaires pour visualiser les distances génétiques entre les échantillons : (1) des réseaux phylogénétiques,

obtenus avec le programme SplitsTree (Huson & Bryant 2006) ; (2) des analyses en composantes principales (ACP) réalisées avec le package R *adegenet* (Jombart 2008). De plus, afin de tester si les groupes génétiques identifiés comme *S. s. terrestris* et *S. s. "hispanica"* résultent de vicariance ou d'isolation par la distance, nous avons calculé les distances génomiques relatives entre chaque échantillon avec MEGA 11 (Tamura *et al.* 2021) et avons testé la corrélation avec leurs distances géographiques grâce à un test de Mantel sur données log-transformées, dont la significativité fut évaluée par 10 000 répliques (ACP; Dray & Dufour 2007).

Minibarcoding

Pour *S. salamandra*, la procédure de minibarcoding développée par Trochet *et al.* (2024) a ciblé un fragment du gène nucléaire *ttn* (183 bp) et un fragment du gène mitochondrial *cox1* (111 bp), analysés chez 98 individus provenant de 49 localités. Ces échantillons comprenaient 9 tissus de la collection BEV (Biogéographie et Ecologie des Vertébrés) du Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE) de Montpellier, ainsi que 89 tissus nouvellement obtenus (Table S3). Ces individus proviennent essentiellement de la région pyrénéenne (obtenus par des naturalistes locaux), exceptés quelques-uns collectés dans la Sarthe (centre de la France) comme références pour *S. s. terrestris*.

Le protocole suivi se base sur ceux décrits par Corse *et al.* (2017) et Thomasdotter *et al.* (2023). Une première PCR permet d'amplifier les fragments cibles grâce à des amorces couplées à des séquences nucléotidiques (« tags ») uniques permettant d'identifier les individus. Les amorces ont été spécifiquement développées sur la base des séquences publiées par des études précédentes (Vences *et al.* 2014 ; Ehl *et al.* 2019), le couple 5'-TGGTGGTGCAGAAATTGACTAC-3' (forward) et 5'-GAGCATTGGCACTGTAAATGG-3' (reverse) pour *ttn*, et le couple 5'-GTAATTGTGACCGCAC ATGCTTCG-3' (forward) et 5'-AATGATGGGGG AAGGAGTCAGAAC-3' (reverse) pour *cox1*. Le programme PCR consiste en 15 minutes à 95°C, puis 35 cycles de 30 secondes à 94°C, 40" à 58°C, et 1 minute à 72°C, suivi de 10 minutes à 72°C. Les produits PCRs sont ensuite vérifiés sur gel d'agarose et purifiées. Une seconde PCR sur les amplicons purifiés permet d'intégrer des adaptateurs universels et des index Nextera® en vue du séquençage Illumina. Les banques ainsi constituées

sont de nouveau purifiées puis séquencées sur NovaSeq 6000 (Illumina). Les données brutes sont filtrées, puis les haplotypes uniques sont identifiés et validés par VTAM (González *et al.* 2023), qui prend notamment en compte le taux d'erreur en lien avec la PCR et le séquençage.

Pour le *cox1*, les séquences de *S. salamandra* disponibles sur GenBank (décembre 2024) ont été récupérées afin de les comparer aux haplotypes issus du minibarcoding, et ainsi d'évaluer leur pouvoir de discrimination pour les taxons cibles (Table S4). Pour ce faire, les séquences ont été alignées dans Seaview (Gouy *et al.* 2010) et leurs divergences relatives ont été visualisées avec un réseau phylogénétique produit avec SplitsTree.

RÉSULTATS

Identification, distribution et introgression entre *S. s. fastuosa* et *S. s. terrestris/"hispanica"*

L'analyse STRUCTURE de 2 786 SNPs obtenus avec la méthode RAD génotypés sur 30 échantillons de *S. s. fastuosa* et *S. s. terrestris/"hispanica"* distingue ces taxons en deux groupes génétiques (Gippner *et al.*, 2024 ; Fig. 2A-B, camemberts). Plusieurs individus présentent des assignations intermédiaires, signe d'introgression, notamment dans les Pyrénées centrales espagnoles et les piémonts français (Bagnères de Bigorre dans les Hautes-Pyrénées ; La Bastide-Clairence dans les Pyrénées-Atlantiques). Le réseau phylogénétique (Fig. 2C) et l'ACP (Fig. 3A) sont en accord avec ce patron d'assignation, les individus assignés aux deux groupes génétiques étant les plus divergents, et les individus métissés ayant des positions intermédiaires.

L'analyse minibarcoding s'est révélée non informative pour le marqueur nucléaire *ttn*, les échantillons partageant tous le même haplotype (enregistré sous GenBank sous l'acquisition PV804993). Une recherche BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de cet haplotype sur GenBank montre qu'il est en effet partagé entre plusieurs sous-espèces très divergentes de *S. salamandra* (KF645459, KF645454, KF645458, KF645452) et même avec l'espèce sœur *S. algira* en Afrique du Nord (KF645460, KF645461, KF645462).

Pour le fragment du gène mitochondrial *cox1*, trois haplotypes ont été identifiés : h1 (PV804990) pour 87 individus échantillonnés dans l'ouest et le centre des Pyrénées ; h2 (PV804991) pour 12 individus échantillonnés dans l'est des Pyrénées et dans la Sarthe ; h3 (PV804992) pour un individu collecté le long de la Baïse dans les Hautes-Pyrénées. Soixante séquences de *cox1* attribuées à *S. salamandra* figuraient sur GenBank au moment de nos analyses, représentant 9 sous-espèces et correspondant à 10 haplotypes pour le fragment ciblé (Fig. 2D). L'haplotype h1 est identique à une seule séquence GenBank, attribuée à *S. s. fastuosa* (en jaune sur la Fig. 2) ; h2 est identique à 13 séquences GenBank de sources diverses, partagées par cinq sous-espèces différentes, y compris *S. s. terrestris* (en bleu sur la Fig. 2) ; enfin, h3 correspond à 11 séquences GenBank, toutes retrouvées chez la sous-espèce Italienne *S. s. gigliolii* (en gris sur la Fig. 2). Ce partage d'haplotypes s'explique par le fait que la séquence courte ciblée (111 bp) est sujette au tri de lignées incomplet (du fait de l'origine récente des sous-espèces) et d'hybridation passée entre certaines

sous-espèces (*S. s. salamandra/gigliolii* dans le nord des Apennins ; Bisconti *et al.* 2018). En outre, la diversité des taxons cibles n'est potentiellement pas entièrement couverte par les séquences GenBank disponibles – les seules séquences publiées de *S. s. terrestris* proviennent d'Allemagne, et *S. s. fastuosa* n'est représentée que par une seule séquence.

Malgré le manque de pouvoir discriminant du fragment cible *cox1* à l'échelle de l'espèce, la distribution géographique des deux haplotypes principaux (h1 et h2), couplée aux résultats RAD, permet néanmoins de les associer aux sous-espèces attendues dans notre aire d'échantillonnage avec une certaine fiabilité : h1 correspond probablement à la lignée mtDNA de *S. s. fastuosa* ; h2 correspond probablement à celle de *S. s. terrestris* et/ou *S. s. "hispanica"* ; h3 pourrait correspondre à l'une ou l'autre de ces lignées. Les répartitions respectives de h1 et h2 sont en accord avec les assignations issues des données génomiques : la lignée *fastuosa* est abondante au centre et à l'ouest des Pyrénées, et la lignée *terrestris/"hispanica"* se retrouve sur la partie orientale du massif (triangles sur la Fig. 2).

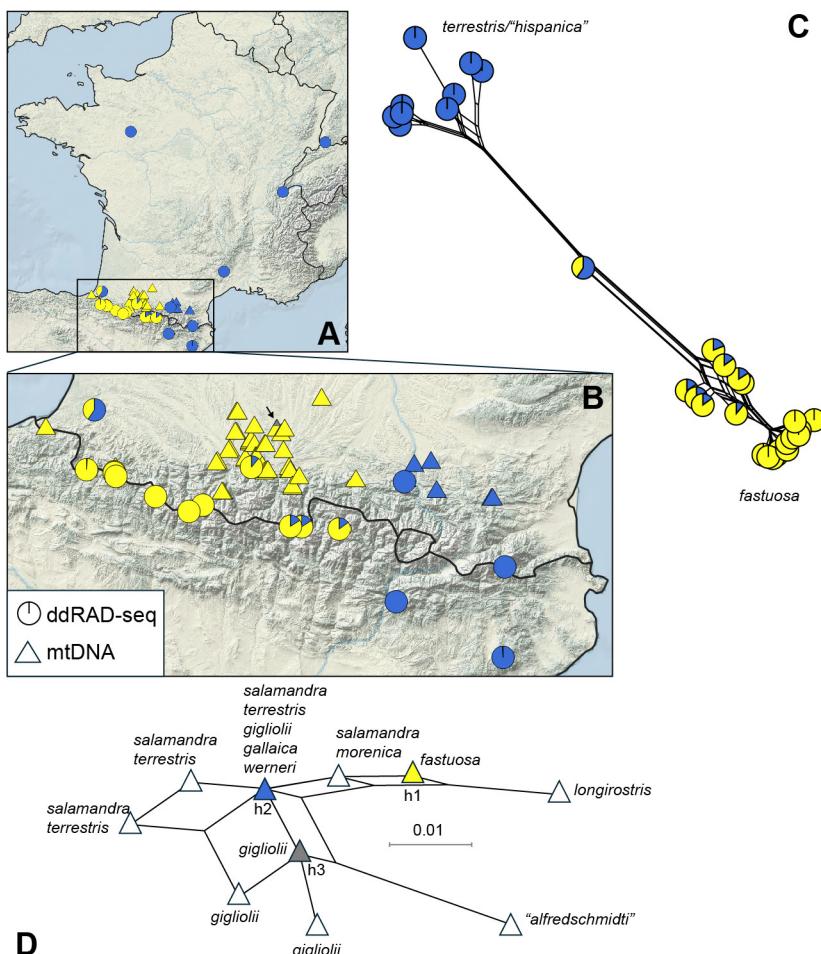


Figure 2 - Distribution et divergence de *S. s. fastuosa* (jaune) et *S. s. terrestris/"hispanica"* (bleu). Les résultats se basent sur l'analyse de marqueurs génomiques RAD (proportion de chaque pool génétique obtenus avec STRUCTURE ; camemberts) et sur un fragment du gène mitochondrial *cox1* (assignation d'haplotypes ; triangles). A : vue générale. B : zoom sur la région Pyrénéenne. C : réseau phylogénétique des marqueurs RAD. D : réseau phylogénétique des haplotypes *cox1*, annoté des sous-espèces partageant chaque haplotype, d'après les séquences disponibles sur GenBank ; l'haplotype h3, jusqu'alors connu uniquement de *S. s. gigliolii*, n'est pas assigné et apparaît en gris.

Figure 2 - Distribution and divergence of *S. s. fastuosa* (yellow) and *S. s. terrestris/"hispanica"* (blue). Results are based on the analysis of RAD genomic markers (proportion of each genetic pool obtained with STRUCTURE; pie charts) and on a fragment of the mitochondrial *cox1* gene (haplotype assignment; triangles). A: overview. B: zoom on the Pyrenean region. C: phylogenetic network of RAD markers. D: phylogenetic network of *cox1* haplotypes, annotated with the subspecies sharing each haplotype, based on sequences available on GenBank; haplotype h3, previously known only from *S. s. gigliolii*, is not assigned and appears in grey.

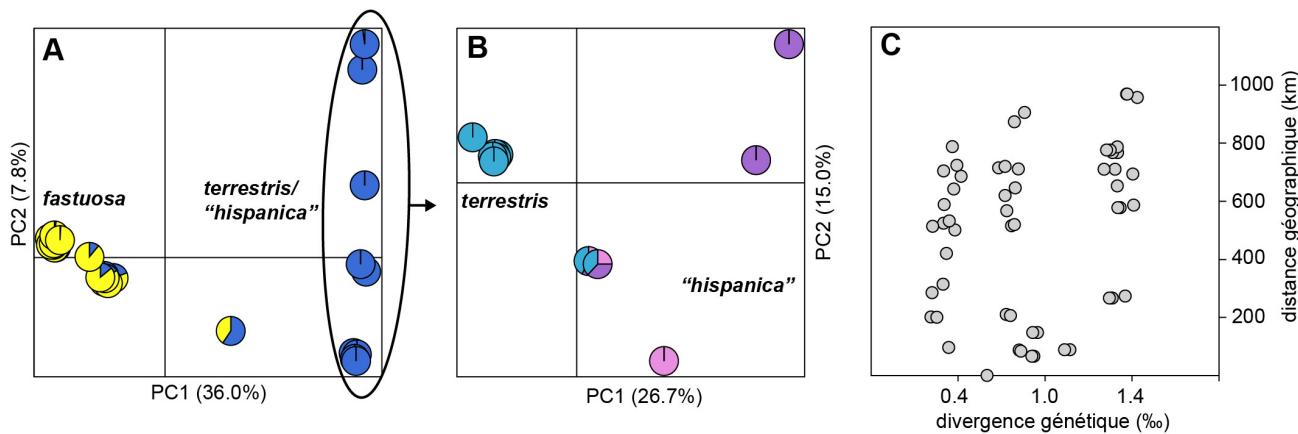


Figure 3 - Evaluation de la structure génétique des sous-espèces étudiées par analyses RAD. A : ACP sur les échantillons de *S. s. fastuosa* et *S. s. terrestris/“hispanica”*. B : ACP sur les échantillons de *S. s. terrestris/“hispanica”*. C : Relation entre divergence génétique et distance géographique (test de Mantel non significatif). Sur les ACPs, les camemberts représentent l'appartenance aux groupes génétiques identifiés par les analyses STRUCTURE de chaque jeu de données.

Figure 3 - Assessment of the genetic structure of the studied subspecies based on RAD analyses. A: PCA of *S. s. fastuosa* and *S. s. terrestris/“hispanica”* samples. B: PCA of *S. s. terrestris/“hispanica”* samples. C: Relationship between genetic divergence and geographic distance (non-significant Mantel test). In the PCAs, pie charts represent assignment to the genetic groups identified by STRUCTURE analyses for each dataset.

Diversification et distribution de *S. s. terrestris* et *S. s. “hispanica”*

L'analyse STRUCTURE de 4 429 SNPs obtenus avec la méthode RAD génotypés chez 11 échantillons de *S. s. terrestris/“hispanica”* distingue trois groupes génétiques, un en France et en Allemagne, correspondant à *S. s. terrestris*, et deux en Espagne (respectivement Montseny et sud des Pyrénées), attribués à *S. s. “hispanica”* (Gippner et al. 2024). Deux échantillons des Pyrénées françaises présentent des assignations intermédiaires aux trois groupes simultanément, suggérant du mélange génétique. Sur l'ACP (Fig. 3B) et sur le réseau (Fig. 4B), les individus assignés aux deux sous-espèces sont bien les plus divergents, avec les deux populations espagnoles bien séparées, et celles de Pyrénées françaises se plaçant au milieu. Ce patron ne semble pas associé à de l'isolement par la distance, les distances génétiques et kilométriques entre les échantillons n'étant pas corrélées (test de Mantel, $r = 0.09$, $P = 0.30$; Fig. 3C).

DISCUSSION

L'objectif de cet article est de fournir un bilan des connaissances sur l'identité et la distribution des sous-espèces de Salamandre tachetée *S. salamandra* en France, en compilant et reprenant les données d'études génétiques récentes. En particulier, la structure génétique mise en évidence par Gippner

et al. (2024) entre les populations de *S. s. terrestris* et *S. s. “hispanica”* semble refléter l'existence de véritables lignées phylogéographiques distinctes, qui formeraient une large zone d'intergraduation dans les Pyrénées françaises (Fig. 3-4). Néanmoins, les analyses de Gippner et al. (2024) n'écartent pas complètement l'hypothèse que les populations de *S. s. “hispanica”* puissent être le fruit d'hybridation anciennes entre des sous-espèces balkaniques et ibériques, ce qui, au passage, n'excluraient pas de la reconnaître comme une sous-espèce valide (comme c'est le cas pour *Alytes obstetricans pertinax* qui présente des traces d'introgression de *A. almogavarri* ; Ambu et al. 2023). Avec une horloge moléculaire, Gippner et al. (2024) avaient estimé la divergence entre *S. s. “hispanica”* et sa plus proche cousine génétiquement (*S. s. terrestris*) au milieu du Pléistocène (1.7 million d'années, Fig. 1), période pendant laquelle les cycles glaciaires de plus en plus accrus ont régulièrement isolé les populations, générant de la structure phylogéographique chez de nombreux amphibiens malgré d'épisodiques contacts secondaires durant les périodes interglaciaires. Ainsi, les populations espagnoles de *S. s. “hispanica”* seraient des « reliques » glaciaires, qui auraient survécu à plusieurs glaciations tout en étant restées globalement isolées de *S. s. terrestris* par la chaîne des Pyrénées, ne se rencontrant et ne se mélangeant que ponctuellement pendant les courtes périodes interglaciaires favorables pour franchir le massif. Ce scénario fait un parallèle

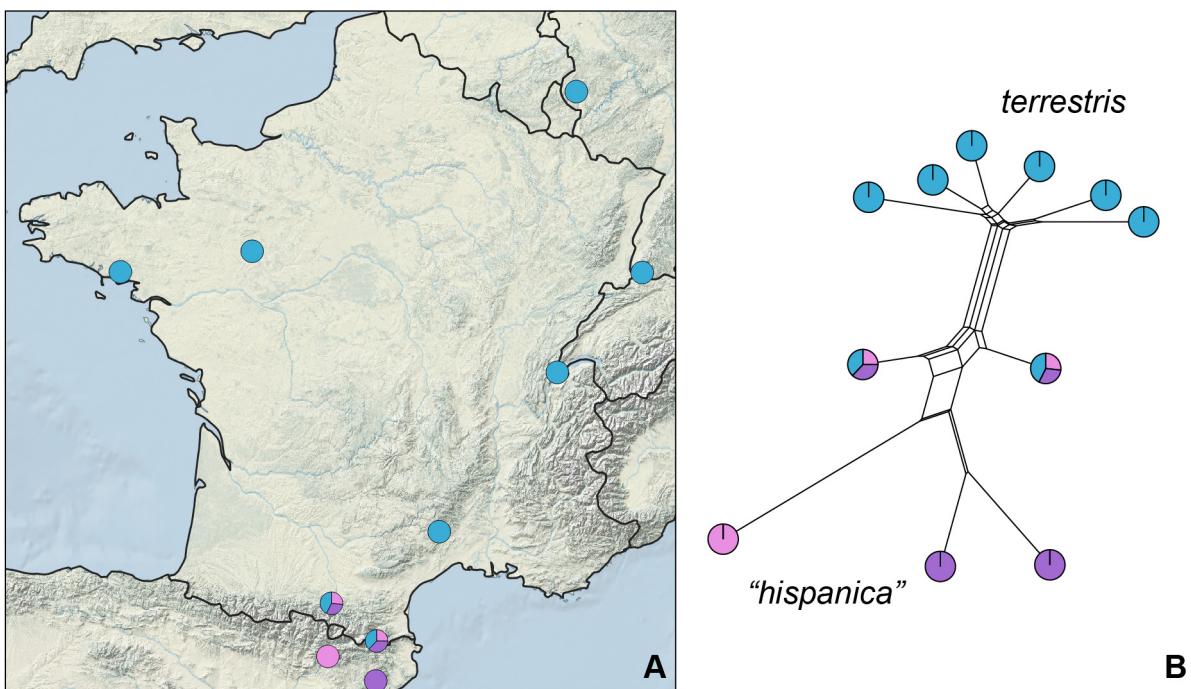


Figure 4 - Répartition et divergence des trois groupes génétiques identifiés chez *S. s. terrestris*/"*hispanica*". Les résultats se basent sur l'analyse de marqueurs génomiques RAD (proportion de chaque pool génétique obtenus avec STRUCTURE ; camemberts). A : distribution géographique. B : réseau phylogénétique.

Figure 4 - Distribution and divergence of the three genetic groups identified within *S. s. terrestris*/"*hispanica*". Results are based on the analysis of RAD genomic markers (proportion of each genetic pool obtained with STRUCTURE; pie charts). A: geographic distribution. B: phylogenetic network.

intéressant avec la diversification des calotritons *Calotriton asper* (Pyrénées) et *C. arnoldi* (Montseny), qui aurait été initiée à la même époque (1.7 million d'années ; Talavera *et al.* 2024), à la différence que ces tritons, inféodés aux milieux plus montagnards, maintiennent une distribution disjointe de nos jours. De même, la différentiation modeste entre les tritons alpestres du nord de l'Espagne (*Mesotriton alpestris cyreni*) et celles d'Europe de l'Ouest (*M. a. alpestris*) traduit vraisemblablement un isolement glaciaire récent de part et d'autre des Pyrénées (Denoël 1996).

La divergence estimée entre *S. s. terrestris* et *S. s. "hispanica"* correspond à l'âge de nombreuses autres sous-espèces de Salamandre tachetée, comme *S. s. werneri*, *S. s. beschkovi* et *S. s. salamandra* dans les Balkans, *S. s. morenica* et *S. s. crespoi* dans la péninsule Ibérique, ou encore à la séparation entre *S. s. fastuosa* et *S. s. gigliolii* (Fig. 1). Si l'on accepte l'idée selon laquelle des lignées phylogéographiques divergentes font de bonnes sous-espèces (Dufresnes *et al.* 2023), il n'y a pas véritablement d'argument pour rejeter *S. s. "hispanica"* sans invalider

toutes les autres sous-espèces de *S. salamandra* présentant une divergence évolutive comparable. De plus, *S. s. "hispanica"* diffère de *S. s. terrestris* par sa coloration, un critère traditionnellement important pour distinguer les sous-espèces de salamandres (Raffaëlli 2022). Néanmoins, une analyse détaillée de la structure génétique des populations de salamandre du quart nord-est de la péninsule ibérique et de l'ensemble de la France, grâce notamment à une couverture géographique plus dense, sera nécessaire pour interpréter l'origine évolutive de *S. s. "hispanica"* au sein de la diversité de l'espèce, en particulier de *S. s. terrestris*. Une telle étude permettra de réévaluer la divergence entre les populations du Montseny (« vraie » *S. s. hispanica*), de la vallée de l'Ebre et du reste de la Catalogne, du sud de la France et des Pyrénées espagnoles, et de les comparer notamment avec celle des *Calotriton*, dont la différentiation entre ces secteurs est bien documentée (voir plus haut). Pour l'heure, nous suivons donc la littérature récente qui présente *S. s. "hispanica"* entre guillemets (Burgon *et al.* 2021 ; Gippner *et al.* 2024) afin de rappeler que sa validité prête à débat.

Bien que *S. s. "hispanica"* ne soit pas présente en France à proprement parlé, ses gènes y pénètrent : les populations françaises les plus au sud correspondent à une zone d'introgression entre *S. s. terrestris* et *S. s. "hispanica"*. Il est possible que la région de la vallée de l'Aude constitue la limite entre les populations métissées et pures de *S. s. terrestris*. On retrouve dans cette même région la transition entre les crapauds accoucheurs *Alytes obstetricans* et *A. almogavarri* (Ambu & Dufresnes 2024) et les couleuvres à collier *Natrix helvetica* et *N. astreptophora* (Asztalos et al. 2020). Il serait intéressant d'analyser la population récemment découverte dans le Minervois (Hernandez & Raffaëlli 2017) ainsi que celles de la Montagne Noire, pour évaluer l'étendue de l'introgression par les gènes de *S. s. "hispanica"* en France.

Sur la base des résultats RAD et mini-barcoding combinés, la Salamandre tachetée fastueuse (*S. s. fastuosa*) paraît restreinte aux Pyrénées centrales et occidentales, et semble échanger ses gènes avec la Salamandre tachetée terrestre (*S. s. terrestris*). Une zone hybride se situerait dans les Pyrénées-Atlantiques, où notre échantillon isolé de La Bastide-Clairence présente une assignation génomique intermédiaire. Plus à l'est, la limite septentrionale de *S. s. fastuosa* reste à clarifier, notamment en élargissant les analyses aux populations du nord du Gers, de Haute-Garonne, et de l'ouest de l'Ariège. Sa limite avec *S. s. terrestris* n'est donc pas nécessairement associée à une transition altitudinale, puisque *S. s. fastuosa* pénètre dans la plaine Aquitaine. Son aire de répartition pourrait, par exemple, atteindre la Garonne, qui fait notamment office de barrière biogéographique chez les rainettes – le fleuve sépare les populations de *Hyla molleri* pures de celles métissées par *H. arborea* depuis le nord-ouest (Dufresnes et al. 2020). Plus à l'est, la transition est également longitudinale, et les données génomiques suggèrent le passage d'une faible introgression par *S. s. terrestris*/*"hispanica"* dans les Pyrénées centrales (où les populations ne portent que l'ADN mitochondrial de *S. s. fastuosa*) à des populations 100% *S. s. terrestris*/*"hispanica"* (au niveau mitochondrial et nucléaire) à l'est des Pyrénées ariégeoises et dans les Pyrénées orientales. Les deux haplotypes mitochondriaux sont séparés d'une cinquantaine de kilomètres entre Saint-Girons (*S. s. fastuosa*) et Foix (*S. s. terrestris*/*"hispanica"*), et il serait très utile d'échantillonner ce secteur le long d'un transect afin de modéliser et comparer les flux géniques à différents marqueurs. De telles analyses pourront

notamment renseigner sur la présence éventuelle de barrières intrinsèques entre les taxons, telles que des incompatibilités génétiques s'exprimant chez leurs descendants hybrides, ce qui permettra d'évaluer leur rang taxonomique en fonction de leur degré d'isolement reproducteur (Dufresnes et al. 2023). Le niveau de divergence entre *S. s. fastuosa* et *S. s. terrestris* pourrait en principe être suffisant pour générer de telles barrières, mais d'autres sous-espèces de Salamandre tachetée tout autant divergentes semblent réussir à mélanger leurs génomes dans leur zone de contact (*S. s. gallaica* et *S. s. bernardezi* ; Velo-Antón et al. 2021). En l'état, il paraît donc prématuré de suggérer un statut spécifique pour *S. s. fastuosa*.

Pour finir, une mise à jour de la distribution des salamandres françaises ne serait pas complète sans étudier la potentielle zone de contact entre *S. s. terrestris* et *S. s. salamandra* près de la frontière franco-italienne. Cette dernière a colonisé le pourtour sud des Alpes depuis les Balkans (Bisconti et al. 2018), et pénétrerait ainsi dans le département des Alpes-Maritimes (Raffaëlli 2022), ce qui reste à clarifier par des analyses moléculaires.

Contribution des auteurs :

Organisation : CD, MV, PAC, AT. Échantillonnage : SG, AH, JA, GP, AT, PAC. Analyses : SG, CD, VD. Rédaction : CD. Relecture : SG, AH, JA, VD, GP, AT, PAC, MV, CD.

REFERENCES

- Ambu J. & Dufresnes C. (2024). Genomic and bioacoustic variation in a midwife toad hybrid zone: A role for reinforcement? *PLoS ONE*, **19**: e0314477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0314477>
- Asztalos M., Schultze N., Ihlow F., Geniez P., Berroneau M., Delmas C., Guiller F., Legentilhomme J., Kindler C. & Fritz U. (2020). How often do they do it? An in-depth analysis of the hybrid zone of two grass snake species (*Natrix astreptophora* and *Natrix helvetica*). *Biological Journal of the Linnean Society*, **131**: 756–773. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa152>
- Beukema W., Nicieza A.G., Lourenço A. & Velo-Antón G. (2016). Colour polymorphism in *Salamandra salamandra* (Amphibia: Urodela), revealed by a lack of genetic and environmental differentiation between distinct phenotypes. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **54**: 127–136. <https://doi.org/10.1111/jzs.12119>
- Bonnet T., Leblois R., Rousset F. & Crochet P.-A. (2017). A reassessment of explanations for discordant introgressions of mitochondrial and nuclear genomes. *Evolution*, **71**: 2140–2158. <https://doi.org/10.1111/evo.13296>

- Burgon J.D., Vences M., Steinfartz S., Bogaerts S., Bonato L., Donaire-Barroso D., Martínez-Solano I., Velo-Antón G., Vieites D.R., Mable B.K. & Elmer K.R. (2021). Phylogenomic inference of species and subspecies diversity in the Palearctic salamander genus *Salamandra*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **157**: 107063. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.107063>
- Corse E., Meglécz E., Archambaud G., Ardisson M., Martin J.F., Tougard C., Chappaz R. & Dubut V. (2017). A from-benchtop-to-desktop workflow for validating HTS data and for taxonomic identification in diet metabarcoding studies. *Molecular Ecology Resources*, **17**: e146–e159. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12703>
- Denoël M. (1996). Etude comparée du comportement de cour de *Triturus alpestris alpestris* (Laurenti, 1768) et *Triturus alpestris cyreni* (Wolterstorff, 1932) (Amphibia, Caudata) : approche évolutive. *Cahiers d'Ethologie*, **16**: 133–258.
- Dubois A. & Raffaëlli J. (2009). A new ergotaxonomy of the family Salamandridae Goldfuss, 1820 (Amphibia, Urodela). *Alytes*, **26**: 1–85.
- Dufresnes C. (2019). *Amphibians of Europe, North Africa and the Middle East*. London (Bloomsbury): 1–224.
- Dufresnes C., Berroneau M., Dubey S., Litvinchuk S.N. & Perrin N. (2020). The effect of phylogeography history on species boundaries: a comparative framework in *Hyla* tree frogs. *Scientific Reports*, **10**: 5502. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62382-4>
- Dufresnes C., Poyarkov N. & Jablonski D. (2023). Acknowledging more biodiversity without more species. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **120**: e2302424120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2302424120>
- Donaire D., Rivera X. & Fernandez D. (2014). Colour patterns of *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758) in Catalonia and Europe. *Butlletí de la Societat Catalana d'Herpetologia*, **21**: 37–74.
- Donaire-Barroso, D. & Rivera, X. (2018). La salamandra común *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758) en el subcantábrico: Origen, dispersión, subespecies y zonas de intromisión. *Butlletí de la Societat Catalana d'Herpetologia*, **25**: 49–86.
- Dray S., & Dufour, A. B. (2007). The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* **22**: 1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v022.i04>
- Ehls., Vences M. & Veith M. (2019). Reconstructing evolution at the community level: A case study on Mediterranean amphibians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **134**: 211–225. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.02.013>
- Eiselt J. (1958). Der Feuersalamander *Salamandra salamandra* (L.). Beiträge zu einer taxonomischen Synthese. *Abhandlungen und Berichte für Naturkunde und Vorgeschichte*, **10**: 77–154.
- Freytag G.E. (1955). Feuersalamander und Alpensalamander. *Die Neue Brehm-Bücherei*, **142**: 1–79.
- Gippner S., Strowbridge N., Šunje E., Capstick M., Amat F., Bogaerts S., Merabet K., Preißler K., Galán P., Martínez-Solano I., Bonato L., Steinfartz S., Velo-Antón G., Dufresnes C., Elmer K.R. & Vences M. (2024). The effect of hybrids on phylogenomics and subspecies delimitation in *Salamandra*, a highly diversified amphibian genus. *Salamandra*, **60**: 105–128.
- González A., Dubut V., Corse E., Mekdad R., Dechatre T., Castet U., Hebert R. & Meglécz E. (2023). VTAM: A robust pipeline for validating metabarcoding data using controls. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **21**: 1151–1156. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.01.034>
- Gouy M., Guindon S. & Gascuel O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, **27**: 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Hernandez A. & Raffaëlli J. (2017). Note on the discovery of a new relict population of *Salamandra salamandra* (Amphibia: Salamandridae) from the Minervois in Southern France. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, **28**: 33–36.
- Huson D.H. & Bryant D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, **23**: 254–267. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>
- Jombart T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, **24**: 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Mulder K.P., Alarcón-Ríos L., Nicieza A.G., Fleischer R.C., Bell R.C. & Velo-Antón G. (2022). Independent evolutionary transitions to pueriparity across multiple timescales in the viviparous genus *Salamandra*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **167**: 107347. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107347>
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**: 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Raffaëlli J. (2020). A new classification of the subgenera of *Salamandra* (Amphibia, Urodela, Salamandridae) in the light of recent molecular studies on the genus. *Bulletin de la Société herpétologique de France*, **174**: 1–18.
- Raffaëlli, J. (2022). *Salamanders and Newts of the world*. Penclen (Penclen editions): 1–1100.
- Rivera X., Simon J.G. & Melero J.A. (2019). Rang de longitudes en adultes de *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758) en poblaciones catalanes. *Butlletí de la Societat Catalana d'Herpetologia*, **27**: 79–88.
- Speybroeck J., Beukema W., Bok B. & Van Der Voort J. (2016). *Field guide to the amphibians and reptiles of Britain and Europe*. London (Bloomsbury): 1–432.
- Talavera A., Palmada-Flores M., Burriel-Carranza B., Valbuena-Ureña E., Mochales-Riaño G., Adams D.C., Tejero-Cicuéndez H., Soler-Membrives A., Amat F., Guinart D.,

Carbonell F., Obon E., Marquès-Bonet T. & Carranza S. (2024). Genomic insights into the Montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*), a Critically Endangered glacial relict. *iScience*, **27**: 108665. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108665>

Tamura K., Stecher G. & Kumar S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, **38**: 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Thomasdotter A., Shum P., Mugnai F., Vingiani M., Dubut V., Marschal F., Abbiati M., Chenail A. & Costantini F. (2023). Spineless and overlooked: DNA metabarcoding of autonomous reef monitoring structures reveals intra- and interspecific genetic diversity in Mediterranean invertebrates. *Molecular Ecology Resources*, **23**: 1689-1705. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13836>

Toyama K.S., Crochet P.-A. & Leblois R. (2020). Sampling schemes and drift can bias admixture proportions inferred by STRUCTURE. *Molecular Ecology Resources*, **20**: 1769-1785. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13234>

Trochet A., Dubut V., Dufresnes C., Geniez P. & Crochet P.-A. (2024). *Mise à jour de la répartition des nouvelles espèces d'amphibiens et de reptiles présentes en France hexagonale*. Paris (Société herpétologique de France).

Velo-Antón G., Lourenço A., Galán P., Nicieza A. & Tarroso P. (2021). Landscape resistance constrains hybridization across contact zones in a reproductively and morphologically polymorphic salamander. *Scientific Reports*, **11**: 9259. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88349-7>

Vences M., Sanchez E., Hauswaldt J.S., Eikermann D., Rodríguez A., Carranza S., Donaire D., Gehara M., Helfer V., Lötters S., Werner P., Schulz S. & Steinfartz S. (2014). Nuclear and mitochondrial multilocus phylogeny and survey of alkaloid content in true salamanders of the genus *Salamandra* (Salamandridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **73**: 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.12.009>

Wolterstorff W. (1937). Über *Salamandra salamandra* (= *maculosa*) *hispanica* n. subsp. *Zoologischer Anzeiger*, **118**: 281-282.

Date de soumission : samedi 12 juillet 2025

Date d'acceptation : mercredi 19 novembre 2025

Date de publication : mercredi 4 février 2026

Editeur-en-Chef : Jérémie SOUCHET

Editeur associé : Antoine FOUQUET

Relecteur : Philippe GENIEZ

ANNEXE

Table S1 – Origine géographique et assignations STRUCTURE des 30 échantillons de *S. s. fastuosa* et *S. s. terrestris*/"*hispanica*" analysés par Gippner et al. (2024) avec des marqueurs RAD. La latitude et la longitude sont exprimées en degrés décimaux ; le signe “-” remplace le mot “ouest” pour les longitudes situées à l’ouest du méridien de Greenwich.

Table S1 – Geographic origin and STRUCTURE assignments of the 30 *S. s. fastuosa* and *S. s. terrestris* samples analyzed by Gippner et al. (2024) using RAD markers. Latitude and longitude are expressed in WGS84 decimal degrees; the sign ‘-’ replaces the word ‘west’ for longitudes west of the Greenwich meridian.

Echantillon	Latitude	Longitude	terrestris/ “hispanica”	fastuosa
M30630saxx	42.8690	-0.7116	0	1
M30628saxx	42.8690	-0.7116	0	1
M30631saxx	42.8690	-0.7116	0	1
SO0737safa	42.8132	-0.2895	0	1
M30612safa	42.7718	-0.4141	0	1
M23300safa	43.0309	-1.0791	0	1
M23290safa	43.0244	-1.0805	0	1
M23299safa/BEV.T10285	43.0011	-1.0652	0	1
M23287safa/BEV.14072	43.0011	-1.0652	0	1
M23297safa/BEV.14073	43.0011	-1.0652	0	1
M23863safa	43.0445	-1.3273	0.02	0.99
M23862safa	43.0445	-1.3273	0.01	0.99
M30636saxx	42.6713	0.5921	0.15	0.85
M30634saxx	42.6713	0.5921	0.19	0.81
M30633saxx	42.6713	0.5921	0.16	0.84
M30635saxx	42.6713	0.5921	0.15	0.85
M05359saxx	42.6738	0.4916	0.16	0.84
M05095saxx	42.6562	0.9264	0.16	0.84
M05094saxx	42.6562	0.9264	0.14	0.86
SO0246safa	43.0603	0.1439	0.11	0.89
M23298sate/BEV.T7121	43.4334	-1.2581	0.6	0.41
M05415sahy	42.1777	1.4299	1	0
M05371sahy	42.9661	1.5027	1	0
M05390sahy	42.4075	2.3991	1	0
SO0036sahi	41.8089	2.3828	1	0
SO0034sahi	41.8089	2.3828	0.98	0.02
M23294sate	47.9366	-0.0990	1	0
M23295sate	44.0149	3.6642	1	0
M30664sate	46.2817	6.04677	1	0
X01737sate	47.6474	7.76011	1	0

Table S2 – Origine géographique et assignations STRUCTURE des 11 échantillons de *S. s. terrestris* et *S. s. “hispanica”* analysés par Gippner et al. (2024) avec des marqueurs RAD. La latitude et la longitude sont exprimées en degrés décimaux ; le signe “-” remplace le mot “ouest” pour les longitudes situées à l’ouest du méridien de Greenwich.

Table S2 – Geographic origin and STRUCTURE assignments of the 11 *S. s. terrestris* and *S. s. “hispanica”* samples analyzed by Gippner et al. (2024) using RAD markers. Latitude and longitude are expressed in WGS84 decimal degrees; the sign ‘-’ replaces the word ‘west’ for longitudes west of the Greenwich meridian.

Echantillon	Latitude	Longitude	“hispanica” Montseny	“hispanica” Pyrénées	terrestris
S00085sate	47.6571	-2.7577	0	0	1
M23294sate	47.9366	-0.0990	0	0	1
M23295sate	44.0149	3.6642	0	0	1
M30664sate	46.2817	6.0468	0	0	1
X01737sate	47.6474	7.7601	0	0	1
X02113sate	50.0503	6.4314	0	0	1
M05371sahy	42.9661	1.5027	0.31	0.27	0.43
M05390sahy	42.4075	2.3991	0.37	0.25	0.38
M05415sahy	42.1777	1.4299	0	1	0
SO0034sahi	41.8089	2.3828	1	0	0
SO0036sahi	41.8089	2.3828	1	0	0

Table S3 – Origine géographique des échantillons de *S. salamandra* français analysés par minibarcoding (Trocet et al. 2024) et haplotypes *cox1* correspondant (h1 : *S. s. fastuosa* ; h2 : *S. s. terrestris* ; h3 : non assigné). La latitude et la longitude sont exprimées en degrés décimaux ; le signe “-” remplace le mot “ouest” pour les longitudes situées à l’ouest du méridien de Greenwich.

Table S3 – Geographic origin of French *S. salamandra* samples analyzed by minibarcoding (Trocet et al. 2024) and corresponding *cox1* haplotypes (h1: *S. s. fastuosa*; h2: *S. s. terrestris*; h3: unassigned). Latitude and longitude are expressed in WGS84 decimal degrees; the sign ‘-’ replaces the word ‘west’ for longitudes west of the Greenwich meridian.

Echantillon	Latitude	Longitude	<i>cox1</i> haplotype
SHFS001	42.9185	0.5119	h1
SHFS002	42.9742	1.0732	h1
SHFS003	43.0470	-1.0731	h1
SHFS004	43.0470	-1.0731	h1
SHFS005	43.0470	-1.0731	h1
SHFS006	43.0470	-1.0731	h1
SHFS007	43.0319	0.4806	h1
SHFS008	43.0490	0.4783	h1
SHFS009	42.9344	0.5120	h1
SHFS010	42.9254	0.5107	h1
SHFS011	42.9936	0.5734	h1
SHFS012	43.0325	0.4913	h1
SHFS013	43.4995	0.7663	h1
SHFS014	43.5032	0.7688	h1
SHFS015	43.4997	0.7661	h1
SHFS016	43.0741	1.5916	h2
SHFS017	43.0741	1.5916	h2
SHFS018	42.8470	2.2876	h2
SHFS019	42.8470	2.2851	h2
SHFS020	42.8470	2.2826	h2
SHFS021	42.8957	1.7863	h2
SHFS022	43.0880	1.7431	h2
SHFS023	42.9658	1.5170	h2
SHFS024	43.1090	0.0911	h1
SHFS025	43.0841	-0.1661	h1
SHFS026	43.0859	-0.1617	h1
SHFS027	43.0853	-0.1614	h1
SHFS028	43.1091	0.0916	h1
SHFS029	43.1010	0.0878	h1
SHFS030	43.1007	0.0872	h1
SHFS031	43.1006	0.0870	h1
SHFS032	43.1003	0.0861	h1
SHFS033	43.0270	0.2893	h1
SHFS034	43.0270	0.2893	h1
SHFS035	43.0270	0.2893	h1
SHFS036	43.0270	0.2893	h1
SHFS037	43.0337	0.2821	h1
SHFS038	43.0337	0.2821	h1
SHFS039	43.0250	0.2625	h1
SHFS040	43.0591	0.2403	h1
SHFS041	42.8855	-0.1147	h1
SHFS042	42.8877	-0.1213	h1
SHFS043	42.8859	-0.1156	h1
SHFS044	42.8859	-0.1156	h1
SHFS045	43.2815	0.0050	h1
SHFS046	43.2796	0.0110	h1
SHFS047	43.2813	0.0040	h1
SHFS048	43.2295	0.1399	h1
SHFS049	43.2272	0.1424	h1

Echantillon	Latitude	Longitude	<i>cox1</i> haplotype
SHFS050	43.2255	0.1443	h1
SHFS051	43.1985	0.1727	h1
SHFS052	43.4102	0.0197	h1
SHFS053	43.4088	0.0162	h1
SHFS054	43.4079	0.0140	h1
SHFS055	43.4078	0.0134	h1
SHFS056	43.3248	0.1723	h1
SHFS057	43.3243	0.1730	h1
SHFS058	43.3241	0.1734	h1
SHFS059	43.3238	0.1740	h1
SHFS060	43.3012	0.4363	h1
SHFS061	43.2662	0.4081	h1
SHFS062	43.2959	0.3729	h3
SHFS063	43.2964	0.3728	h1
SHFS064	43.2965	0.3726	h1
SHFS065	43.2965	0.3726	h1
SHFS066	43.1091	0.0920	h1
SHFS067	43.1091	0.0917	h1
SHFS068	43.1091	0.0914	h1
SHFS069	43.1091	0.0906	h1
SHFS070	43.1220	0.1839	h1
SHFS071	43.1218	0.1849	h1
SHFS072	43.1207	0.1856	h1
SHFS073	43.1203	0.1859	h1
SHFS074	43.1585	0.4281	h1
SHFS075	43.1583	0.4279	h1
SHFS076	43.1580	0.4267	h1
SHFS077	43.1581	0.4264	h1
SHFS078	43.1950	0.2651	h1
SHFS079	43.1962	0.2650	h1
SHFS080	43.1978	0.2613	h1
SHFS081	43.1987	0.2573	h1
SHFS082	43.1745	-0.0519	h1
SHFS083	43.1693	-0.0524	h1
SHFS084	43.1688	-0.0545	h1
SHFS085	43.1644	-0.0572	h1
SHFS086	43.1715	-0.0510	h1
SHFS087	43.2129	0.1314	h1
SHFS088	43.2187	0.1255	h1
SHFS089	43.0634	0.1439	h1
BEV.14072/T10282	43.0011	-1.0652	h1
BEV.14073/T10283	43.0011	-1.0652	h1
BEV.15030/T13502	47.9366	-0.0990	h2
BEV.15258/T13503	47.9366	-0.0990	h2
BEV.15259/T13504	47.9366	-0.0990	h2
BEV.16051/T15773	42.9742	1.0732	h1
BEV.500/T10372	43.3118	-1.6930	h1
BEV.8335/T10373	43.0244	-1.0805	h1
BEV.T10285	43.0011	-1.0652	h1

Table S4 - Détails des 60 séquences *cox1* disponibles sur GenBank pour comparaison avec le fragment analysé par minibarcoding. L'identifiant peut se référer à un spécimen, un échantillon ou un haplotype, selon les études. Les origines géographiques sont données pour confirmer l'attribution des séquences aux sous-espèces. Des informations supplémentaires sont à retrouver dans les publications correspondantes comme suit: ¹Smith et al. (2008) *Molecular Ecology Resources*, 8: 235–246 ; ²Vences et al. (2014) *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 73: 208–216; ³Ehl et al. (2019) *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 34: 211–225; ⁴Zangl et al. (2020) *PLoS ONE* 15: e0229353 ; ⁵iBOL (unpublished); ⁶Hawlitschek et al. (unpublished); ⁷Bisconti et al. (2018) *Scientific Reports*, 8: 13187.

Table S4 - Details of the 60 *cox1* sequences available on GenBank for comparison with the fragment analyzed by minibarcoding. The identifier may refer to a specimen, a sample, or a haplotype, depending on the studies. Geographic origins are provided to confirm assignment of the sequences to subspecies. Additional information can be found in the corresponding publications as follows: ¹Smith et al. (2008) *Molecular Ecology Resources*, 8: 235–246 ; ²Vences et al. (2014) *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 73: 208–216; ³Ehl et al. (2019) *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 34: 211–225; ⁴Zangl et al. (2020) *PLoS ONE* 15: e0229353 ; ⁵iBOL (unpublished); ⁶Hawlitschek et al. (unpublished); ⁷Bisconti et al. (2018) *Scientific Reports*, 8: 13187.

Accession	Sous-espèce	Identifiant	Origine géographique	Référence
EF525915	<i>salamandra</i>	RUHF-SSS-01-3	Ukraine, Transcarpathie	1
EF525914	<i>salamandra</i>	RUHF-SSS-01-4	Ukraine, Transcarpathie	1
EF525913	<i>salamandra</i>	RUHF-SSS-01-2	Ukraine, Transcarpathie	1
EF525912	<i>salamandra</i>	RUHF-SSS-01-1	Ukraine, Transcarpathie	1
EF525911	<i>salamandra</i>	RUHF-SSS-02-1	Ukraine, Transcarpathie	1
KF645982	<i>longirostris</i>	DD_I5E	Espagne, Chiclana de la Frontera	2
KF645981	<i>longirostris</i>	SEI3	Espagne, Grazalema	2
KF645989	“ <i>alfredschmidti</i> ”	SS_56	Espagne, Asturies, Tendi	2
KF645988	“ <i>alfredschmidti</i> ”	SS_58	Espagne, Asturies, Tendi	2
KF645987	“ <i>alfredschmidti</i> ”	SS_57	Espagne, Asturies, Tendi	2
KF645986	<i>wernerii</i>	SEI7	Grèce, Péloponnèse	2
KF645985	<i>gigliolii</i>	SPM_780	Italie, Serra de San Bruno	2
KF645984	<i>morenica</i>	SS_34	Espagne, Cazalla de la Sierra	2
KF645983	<i>morenica</i>	MVDNA_2829	Espagne, Puebla de los Infantes	2
KF645980	<i>gallaica</i>	SEI6	Espagne, Isla de Ons	2
KF645979	<i>salamandra</i>	GAR02	Italie, Garda	2
KF645978	<i>fastuosa</i>	SS_59	France, Cauterets	2
MK511431	<i>terrestris</i>	E171249	-	3
MN993223	<i>salamandra</i>	HERP165	Autriche, Styrie, Graz	4
MN993222	<i>salamandra</i>	HERP4	Autriche, Haute-Autriche, St. Ulrich	4
MN993221	<i>salamandra</i>	HERP1	Autriche, Tyrol, Wilferental	4
MN993220	<i>salamandra</i>	HERP195	Autriche, Styrie, St. Josef, Bienenhuette	4
MN993219	<i>salamandra</i>	HERP134	Autriche, Haute-Autriche, Dambach	4
HQ954805	<i>salamandra</i>	BC_ZSM_HERP_178	Allemagne, Bavière, Kraiburg	5
KP697941	<i>salamandra</i>	GBOL03550	Allemagne, Bavière, Klingenberg am Main	6
KP697928	<i>salamandra</i>	GBOL03552	Allemagne, Bavière, Klingenberg am Main	6
KP697895	<i>terrestris</i>	ZFMK-TIS-5041	Allemagne, Rhénanie du Nord-Westphalie, Koenigswinter-Rhoendorf	6
KP697873	<i>terrestris</i>	ZFMK-TIS-5044	Allemagne, Bade-Wurtemberg, Schallstadt	6
KP697864	<i>salamandra</i>	GBOL03551	Allemagne, Bavière, Klingenberg am Main	6
KP697863	<i>salamandra</i>	GBOL03549	Allemagne, Bavière, Klingenberg am Main	6
KP697857	<i>salamandra</i>	BC_ZSM_HERP_177	Allemagne, Bavière, Muehldorf am Inn	6
KP697841	<i>salamandra</i>	BC_ZSM_HERP_86	Allemagne, Bavière, Berchtesgaden	6
KP697838	<i>salamandra</i>	BC_ZSM_HERP_176	Allemagne, Bavière, Muehldorf am Inn	6
KP697835	<i>salamandra</i>	BC_ZSM_HERP_179	Allemagne, Bavière, Muehldorf am Inn	6
KP697833	<i>terrestris</i>	ZFMK-TIS-2513739	Allemagne, Rhénanie du Nord-Westphalie, Alt-Windeck	6
MH668127	<i>salamandra</i>	N25	Italie, Campone	7
MH668126	<i>salamandra</i>	N24	Italie, Campone	7
MH668125	<i>salamandra</i>	N23	Italie, Campone	7
MH668124	<i>salamandra</i>	N22	Italie, Campone/Banco	7
MH668123	<i>salamandra</i>	N21	Italie, Sampeyre	7
MH668122	<i>salamandra</i>	N20	Italie, Manie	7

Accession	Sous-espèce	Identifiant	Origine géographique	Référence
MH668121	<i>salamandra/</i> <i>gigliolii</i>	N19	Italie, Vallecaldà	7
MH668120	<i>gigliolii</i>	N18	Italie, Cipollaio	7
MH668119	<i>salamandra/</i> <i>gigliolii</i>	N17	Italie, Camaldoli/Cipollaio/Passo del Bracco/Colle S. Bartolomeo/Sampeyre	7
MH668118	<i>gigliolii</i>	N16	Italie, Pescolanciano/Val Fondillo	7
MH668117	<i>gigliolii</i>	N15	Italie, Giffoni	7
MH668116	<i>gigliolii</i>	N14	Italie, Cervinara/Giffoni	7
MH668115	<i>gigliolii</i>	S13	Italie, Giffoni	7
MH668114	<i>gigliolii</i>	S12	Italie, Laurino/S. Severino Lucano	7
MH668113	<i>gigliolii</i>	S11	Italie, S. Severino Lucano	7
MH668112	<i>gigliolii</i>	S10	Italie, S. Severino Lucano	7
MH668111	<i>gigliolii</i>	S9	Italie, Fagnano Castello	7
MH668110	<i>gigliolii</i>	S8	Italie, Fagnano Castello	7
MH668109	<i>gigliolii</i>	S7	Italie, Villaggio Mancuso	7
MH668108	<i>gigliolii</i>	S6	Italie, Villaggio Mancuso	7
MH668107	<i>gigliolii</i>	S5	Italie, Villaggio Mancuso	7
MH668106	<i>gigliolii</i>	S4	Italie, Carmelia	7
MH668105	<i>gigliolii</i>	S3	Italie, Carmelia	7
MH668104	<i>gigliolii</i>	S2	Italie, Carmelia/Gambarie/Serra S. Bruno	7
MH668103	<i>gigliolii</i>	S1	Italie, Carmelia/Gambarie	7