



RAPPORT d'avancement des travaux

AAPP Biodiversité : Ecologie et Biodiversité du Barbeau méridional- ECOBAM

N° AAP 413 2017 243 OSB

Date Mai 2020

R. Chappaz, A. Gilles, E. Guivier, N. Pech, B. Barascud et G. Olivari

Nos sincères remerciements à P. Berrebi et H. Persat pour la relecture scientifique, les remarques judicieuses et les améliorations apportées au document.

Fédérations Départementales des Associations Agrées de Pêche et Protection des Milieux Naturels : Alpes de Haute Provence (V. Duru, C. Samaille, L. Guien), Haute Alpes (D. Doucende), Alpes Maritimes (C. Barla, A. Marin et R. Passeron), Ardèche (C. Boucansaud), Aude (), Bouches du Rhône (S. Conan), Drômes (Y. Monnier et L. Marion), Gard (J. Crebassa et J. Marais), Hérault (E. Ravel et F. Masset), Isère (G. Bourlet), Lozère (V. Prouha, J. Gille, V. Marin), Pyrénées orientales (O. Baudier), Rhônes (J-P. Faure), Haute Savoie (C. Chasseriau), Var (O. Bonnefous, J. Preynat, L. Laton) et Vaucluse (C. Tharel).

Maison Régionale de l'Eau : C. Garrone, J. Mattei, R. Castelin, P. Milesi, K. Viciana et G. Olivari

Université d'Aix Marseille : C. Pech

Office Français de la Biodiversité : B. Tamagna, G. Verdier, P. Moullec, M. Cagnan, M. Niveau.



Préambule

Cette étude a pour mission de faire l'état de populations de Barbeaux méridionaux sur la plus grande partie de son aire de répartition Française avec plusieurs approches, qualité des milieux d'un point de vue ponctuel via la physico-chimie et l'analyse du microbiome libre dans l'eau (bactérioplancton), du microbiome de la peau et de la diversité génétique de différentes populations sur 55 stations d'études réparties sur l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce : 1218 barbeaux ont fait l'objet de prélèvement durant l'été 2018. A ces individus s'ajoutent les prélèvements de barbeaux réalisés par la FDAAPM du Gard, sur le Vidourle et le Véron (38 individus).

INTRODUCTION

L'université nous a informé, le 8 février 2018, que le projet d'étude ECOBAM tel que présenté dans le cadre de l'Appel d'Offres « Biodiversité 2017 » avait reçu un avis favorable (mail de Madame V. Duros, Gestionnaire administrative campus).

Le 17 septembre 2018, un mail de Madame Stéphanie Estor, responsable administrative OSU Pythéas nous informait que madame Causi Marie-Rose de l'Antenne Marseille-Luminy serait notre gestionnaire pour cette convention d'études. Dans la semaine qui a suivi nous avons été informé de la création d'un code financier et de l'ouverture des crédits avec 4 mois de retard.

Nous tenons à remercier tous les participants à la première partie de l'étude, Maison Régionale de l'Eau, Chargés de missions des Fédérations de pêche et Protection des milieux aquatiques, Inspecteurs de l'Agence Française pour la Biodiversité et Agents de l'Université : tous ont œuvrés pour réaliser la première partie, au combien déterminante de l'étude, les prélèvements en rivière. Tous ont su s'adapter à nos campagnes de prélèvements, modifiant leur propre emploi du temps, pour permettre la réalisation de ce programme, malgré une activité estivale chargée. Nous tenons à remercier également le Dr. Patrick Berrebi et le Dr. Henri Persat qui possèdent de grandes connaissances sur l'espèce et qui ont accepté une relecture critique de ce rapport d'avancement des travaux.

Une grande équipe très motivée s'est formée, à nous tous d'échanger maintenant sur les résultats.

L'analyse du génome nucléaire n'a pu être réalisée en raison du confinement.

Ce rapport se présente en deux parties :

- Le présent document qui développe la méthode, les résultats et analyses
- Un second document qui illustre géographiquement les différentes stations prospectées

Plan succinct :

1. Résumé de la réponse à l'appel d'offre « Biodiversité 2017 »	4
2. Programme temporel	5
3. Récapitulatif de l'obtention des permis de pêche	6
4. L'espèce, synthèse bibliographique	7
5. Le Protocole de prélèvements – Méthodes	9
5.1. Echantillons poissons	9
5.2. Analyses d'eau	10
5.3. Analyses de l'ADN mitochondrial	13
5.4. Analyses du microbiome	13
5.5. Analyses de l'ADN nucléaire (en cours)	16
6. Résultats	16
6.1. Bilan des campagnes de prélèvements	16
6.2. Analyses physico-chimique de l'eau	22
6.3. Analyses de l'ADN mitochondrial	24
6.4. Analyses du microbiome	37
6.5. Biocénose et biotopes	58
7. Conclusions partielles	62
8. Bibliographie	

1. Résumé de la réponse à l'appel d'offre

L'objectif de cette étude vise une meilleure compréhension des réponses à court et long termes de plusieurs populations d'une espèce endémique française, **le barbeau méridional** (BAM) exposée, au changement global considéré dans ses composantes thermiques, hydrologiques, géographiques (occupation de l'espace), chimiques (pollutions) et accidentelles (introductions d'espèces). Les connaissances seront ensuite mobilisées pour développer des outils de gestion en vue de la préservation de la biodiversité au niveau de l'ensemble du bassin du Rhône et des fleuves côtiers à l'Est et à l'Ouest du Rhône en lien avec les Fédérations Départementales de Pêche et Protection des Milieux Aquatiques.

Facteurs d'impact étudiés : altération de la connectivité (dégradation ou fractionnement de l'habitat par divers aménagements), et qualité des milieux d'eau douce continentaux.

Modèle biologique : populations de Barbeau méridional (*Barbus meridionalis*, Risso, 1826) BAM.

Milieux d'étude particuliers : cours d'eau (Rhône, Durance, Argens, Var, Ardèche, Gardons, Drôme, Usses, fleuves côtiers méditerranéens).

Partenaires du programme:

- **La Maison Régionale de l'Eau** (MRE) est un centre de ressources et d'études sur les milieux aquatiques, installé dans le Haut Var à Barjols. Cette structure associative est composée de deux pôles complémentaires dont l'un est consacré à l'éducation à l'environnement et au développement durable et l'autre aux études scientifiques. Les bénéfices dégagés par l'activité bureau d'études sont aussitôt réengagés dans l'éducation à l'environnement. Tous les personnels sont sous contrat à durée indéterminée et sous la Convention collective de l'Animation
- **Les Fédérations départementales de pêche des départements suivants**, Alpes Maritimes, Alpes de Haute Provence, Ardèche, Aude, Bouches du Rhône, Drôme, Gard, Hautes Alpes, Haute Savoie, Hérault, Isère, Lozère, Pyrénées orientales, Rhône, Var et Vaucluse qui sont gestionnaires des cours d'eau départementaux et qui ont proposé plusieurs stations d'études départementales concernant l'espèce avec des problématiques particulières (liées à la qualité de l'eau, la fragmentation des populations, des projets de rétablissement de la continuité ou bien encore l'intérêt d'étudier le génome, la biodiversité et l'hybridation). Il faut préciser que le barbeau méridional se trouve dans d'autres départements, notamment la Garonne et l'Ariège mais aussi en Catalogne Espagnole. Il convient de signaler aussi que la reconnaissance des scientifiques de la présence de BAM uniquement en France et en Espagne du nord-est est récente (vers 2000), grâce aux travaux de Tsigenopoulos. Auparavant, on pensait que l'aire de répartition du BAM s'étendait jusqu'en Europe centrale: " Des études génétiques ont montré que *B. meridionalis* était strictement limité au Sud de la France (principalement bassin Rhône-Méditerranée) et au Nord-Est de l'Espagne. Les taxons anciennement considérés comme des sous-espèces sont en fait des espèces valides : *B. caninus* en Italie, *B. peloponnesius* en Grèce et *B. petenyi*, *B. carpathicus* et *B. balcanicus* dans le Danube pour les principales."

Dans plusieurs départements, le service départemental de l'AFB est intervenu pour participer à la sélection des stations, Lozère, Alpes de Haute Provence, Ardèche, Hautes Alpes et Var, par exemple.

De ces échanges, 48 stations ont été choisies en préalable pour définir les secteurs et le budget de l'étude. En réalité le nombre de stations sera revu à la hausse sous l'effet de demandes ponctuelles des équipes gestionnaires et de la difficulté à capturer l'espèce sur certaines stations après les étiages sévères de 2017.

Le projet porte sur deux axes principaux:

- axe 1 - Mise en œuvre opérationnelle des plans de gestion par les Fédérations Départementales des Associations agréées Pêche et Protection des milieux naturels
- axe 2 - Améliorer la connaissance de la biodiversité de l'espèce pour tous les gestionnaires, Fédérations bien sûr mais aussi Parcs et Services de l'Etat, Office Français de la Biodiversité, Directions Départementales des Territoires et DREAL, Muséum National d'Histoire Naturelle.

2. Programme :

Le programme ECOBAM avait posé pour préambule, des campagnes de prélèvements en période chaude, de façon à comparer des populations de barbeaux dans des ambiances thermiques voisines, ambiances qui se voulaient plus contraignantes (étiage, thermie, oxygène dissous, densité, ...). De ce fait, tous les prélèvements devaient être réalisés sur une seule période estivale, la période estivale 2018.

Toutes les captures devaient être réalisées pour octobre 2018.

3. Récapitulatif de l'obtention des permis de pêche

Les demandes de permis de pêches scientifique ont été entreprises dès le mois de mars 2018, parfois plus tardivement quand il s'est avéré que la Fédération Départementale ne pouvant être disponible, l'association MRE – Université, devait réaliser l'intervention.

A plusieurs reprises, les pêches de prélèvements de barbeaux ont été réalisées dans le cadre des opérations de la Fédération ou de l'AFB, et dans ce cas, nous n'avons pas sollicité de permis scientifique.

A de rares exceptions liées à un « impondérable », pêche de sauvetage de dernière minute, réunions en DDT, nous avons été accompagné sur les stations de pêches par un – ou plusieurs représentant(s) de la Fédération et de l'AFB qui avait préparé la pêche (contacts auprès des propriétaires riverains, participation active aux prélèvements) : c'est d'un grand confort pour un prélèvement réussi !

Départements	N° permis si précisé	Date
04	2018- 115- 004	25/04/2018
05	05- 2018.04.25-001	25/04/2018
06	DDTM-SEAFEN- PE- AP n°2018-050	12/06/2018
11		10/09/2018
13		28/06/2018
26	2018- 150- 0007	29/05/2018
30	30- 2018- 07-05-003	05/07/2018
34	FEDERATION	
38	N° 38.2018. 135DDTSE01	15/05/2018
48	DDT- BIEF- 143- 0005	23/05/2018
66	DDTM/SER/2018 131-0001	11/05/2018
74	FEDERATION	
83		18/05/2018
84	DDT/SEEF - 2018- 148	17/04/2018

Tabl I. Tableau général des permis de pêche

4. L'espèce

Le barbeau méridional, *Barbus meridionalis* (Risso, 1826) - (BAM) est une espèce de petite taille, les individus dépassent rarement 250mm (LT) pour 200g (Keith et al. 2011), il se rencontre dans des eaux oxygénées à une altitude généralement supérieure à 200m. En France, sa présence est strictement limitée au sud, bassin du Rhône et fleuves côtiers à l'Est et à l'Ouest du Rhône ; c'est une espèce endémique. Pour P. Berrebi, sa présence en Catalogne espagnole est antérieure aux dernières glaciations (Keith et al., 2011). A notre connaissance, *B. meridionalis* n'a pas fait l'objet de nombreuses études d'écologie (croissance, alimentation, fécondité, habitat) mais nous avons trouvé trace d'un travail de Diplôme d'Etudes Approfondies (Pouyaud L. 1990- DEA Montpellier 2) que P. Berreby a pu nous procurer.

P. Berrebi indique que sa répartition en altitude dans les cours d'eau où *Barbus barbus* (BAF) est présent serait dû à une exclusion compétitive entre les deux espèces. Lorsqu'elles sont en sympatrie, les deux espèces peuvent s'hybrider et on observe alors une répartition longitudinale dans le cours d'eau : *B. barbus* occupant la zone la plus basse de répartition des barbeaux, les hybrides quand ils existent, la zone intermédiaire et *B. meridionalis* occupant les zones apicales comme sur la Lergue. La présence du BAM en plaine dans les départements des Pyrénées orientales, du Var et de l'Hérault témoigne souvent de l'absence de *B. barbus*. Le barbeau méridional a fait l'objet d'études de son comportement de reproduction en aquarium à partir d'individus provenant de l'Aubaygne, un affluent de la Lergue. Poncin (1994) constate, en aquarium, que les comportements de reproduction de *B. barbus* et celui de *B. meridionalis* sont très voisins à ceux déjà décrits par Gougnard et al (1987) chez *B. barbus*.

La génétique de l'espèce a fait l'objet de nombreuses études sous la direction de Patrick Berrebi, ses études ont grandement contribué à la prise en compte de l'espèce dans les politiques publiques et à l'intérêt porté à l'espèce par les gestionnaires des cours d'eau (Berrebi et al. 1988 ; Persat et Berrebi, 1990 ; Jeandarme et al. 1992 ; Crespin et Berrebi, 1994 ; Berrebi et Tsigenopoulos, 2003).

Le Brun (1989) met en évidence la présence d'un parasite de *B. meridionalis* sur la Lergue, il décrit un modèle Diplozoon- Cyprinidae, pour lequel le parasite est présent chez le BAM mais absent chez le BAF : l'absence serait dû à une différence de milieux de vie entre les deux espèces. Gettova et al. (2016) vont s'intéresser aussi aux parasites des deux espèces et de leurs hybrides, sur certains secteurs de cours d'eau, bassins de la Durance, l'Ardèche et l'Argens, mais ce parasite monogène (Diplozoon) ne sera pas retrouvé sur les populations étudiées.

De par sa répartition dans des affluents de petites tailles, le *B. meridionalis* paraît bien menacé par les modifications anthropiques du milieu et plus particulièrement par le réchauffement climatique. Son classement dans la liste rouge du Comité français de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (2009) est faible (NT) c'est-à-dire « Quasi menacée ». Si l'espèce figure en « espèces non classées » sur la liste hiérarchisée d'espèces pour la conservation en France (Savouré-Soubelet, 2015), le BAM est cependant protégé au niveau national et mentionnée sur l'Arrêté interministériel du 08 décembre 1988, inscrit sur l'annexe III de la convention de Berne (1979), aux annexes II et V de la Directive Européenne « Habitat Faune Flore » (1992).

Dans les rivières, les zones Natura 2000 cependant, sont souvent limitées au cours d'eau principal et ne développent pas de mesures de protection pour le B. méridional souvent présent

uniquement sur les affluents, c'est-à-dire, hors emprise du Natura 2000 comme par exemple la Durance (FRE 9301589), le Buech (FRE 9301519), le Tech (FRE 9101478) et le Verdon (FRE 9301616).

Notre étude a montré que l'espèce a été très sensible aux températures élevées de l'été 2017, températures et faible pluviométrie ont entraîné des assecs importants. En 2018, beaucoup de stations « à BAM » ont montré aucun individu ou un nombre d'individus très faible, insuffisant pour notre étude ; c'est le cas pour l'Aillade (Vaucluse), des stations de Lozère, des stations des Alpes de Haute Provence et des Hautes Alpes.

En revanche, nous avons pu échantillonner l'espèce sur l'Ebron, affluent du Drac, l'une des deux stations décrites, dans les Alpes du Dauphiné, par Léger (1910), puis Blaive (1933-34). Dorier (1957) mentionnait que la limite septentrionale de l'espèce se situait en deçà « *d'une ligne formée par les stations de l'Ay et de la Galaure, (...) toutes stations situées un peu en amont du confluent avec l'Isère* ». Même si deux des populations étudiées dans le cadre du programme ECOBAM, sont des stations plus amont, l'Aulin (dpt 69) et le Fornant (dpt 74), une station « Conan » (dpt 69), ne permet désormais plus de captures (Gleize, 2009 ; Henri Persat et Jean Pierre Faure *com. pers.*).

La répartition discontinue des populations actuelles de BAM témoigne, indique Spillmann (1961), d'une distribution ancienne beaucoup plus vaste : les populations de barbeaux méridionaux présentent une nette régression depuis une soixantaine d'années (voir travaux de Dorier 1957).

A l'opposé, les populations de BAF s'étendent du fait d'introductions, sur des bassins versants où l'espèce n'existe pas. Le BAF colonise maintenant largement le fleuve Argens où l'on rencontre de nombreux hybrides (Gettova *et al.* 2016) ; il n'était mentionné que dans l'Argens moyen par Kiener *et al* (1981). Le BAF reste absent de certains fleuves côtiers à l'est du Rhône, l'Huveaune, le Réal Martin, le Var, la Siagne, le Loup, la Tinée, la Bévéra et à l'ouest du Rhône, les cours d'eau des Pyrénées orientales, Agly, Tech, Têt et Salse.

Rappelons à toutes fins utiles que notre projet est d'étudier les populations les plus sensibles sur lesquelles un besoin de connaissances est nécessaire pour les gestionnaires des milieux aquatiques.

Dans la bibliographie de l'espèce, l'analyse par électrophorèse de protéines enzymatiques montre un polymorphisme plus élevé chez les *B. meridionalis* du Roussillon et situe là, la zone refuge de l'espèce pendant les dernières glaciations ; il est vraisemblable que des individus de la bordure méditerranéenne du Roussillon ont pu, par la suite, recoloniser le bassin du Rhône (Berrebi *et al.* 1988 ; Persat et Berrebi, 1990 ; Crespin & Berrebi, 1994). Plus récemment Markova *et al* 2010, confirment, en étudiant le gène complet du *Cyt b* (ADN mitochondrial) de quelques individus de *B. méridional* (individus provenant du Conan, Aulin, Bevera, Fornant et Massane- dpt 66), que l'espèce est monomorphe. Dans leurs conclusions, les auteurs invitent les études à venir, à s'intéresser à d'autres marqueurs mitochondriaux et à des marqueurs nucléaires de type microsatellites.

5. Méthodes utilisées :

5.1. Populations de barbeaux

Les captures ont été réalisées par pêches électriques avec différents types d'appareils, appareils portables souvent, thermique ou électrique. Parfois nous avons eu recours à du matériel plus lourd de type EFKO lorsque la largeur et la profondeur de la station l'exigeait

Objectif : Il était nécessaire de capturer à minima 20 barbeaux méridionaux ; parfois cependant plus d'individus ont été capturés lorsque nous pressentions la présence d'hybrides avec le barbeau fluviatile.

Les prélèvements d'eau pour analyses chimiques et mesures physico-chimiques « *in situ* » sont réalisées avant les captures. L'échantillon pour analyse physicochimique de l'eau était placé en glacière jusqu'à son acheminement vers le laboratoire agréé.

La pêche se déroule de l'aval - vers l'amont, parfois sur plusieurs centaines de mètres selon une technique très classique.

Les poissons capturés étaient conservés dans un seau si l'ensemble des captures était rapide, en stabulation dans un bac en rivière si les captures nécessitaient plus de temps. Les espèces d'accompagnement, lorsqu'elles existaient, sont mentionnées sur chacune des fiches station.

Par la suite, la table de biométrie étant installée et désinfectée, débutent les prélèvements individuels : prélèvement d'un morceau de nageoire caudale, réalisé avec ciseau et pince et stocké individuellement dans l'alcool ; dans le même mouvement le poisson est immédiatement mesuré et pesé puis remis à l'eau à proximité de sa zone de capture. Avec de la pratique, l'intervention dure entre 15 et 20 secondes. Un numéro de code lui est attribué (première colonne du tableau II). Les barbeaux de moins de 60mm sont mesurés, mais jugés trop petits ils n'ont pas souvent été utilisés pour l'analyse. De même, lorsque les individus capturés étaient nombreux, les individus excédentaires étaient simplement mesurés pour apporter des informations via l'histogramme des captures. Lorsque le nombre d'individus était trop faible, un effort de pêche plus intense a été appliqué ; parfois sans succès.

La longueur à la fourche (LF) a été utilisée en mm, la masse en grammes. Afin de transformer longueur à la fourche en longueur totale (LT), l'équation correspondant à une courbe linéaire a été calculé :

$$LT = 1.0241 LF + 1.8297, R^2 = 0.999$$

Chacune des stations a fait l'objet de la rédaction d'une fiche standard mentionnant sa localisation, une ou des photographies et des caractéristiques physiques du milieu. Au fur et à mesure de l'acquisition des résultats physico-chimiques, les informations recueillies sont mentionnées sur cette fiche. Les fiches en cours de rédaction, au fur et à mesure des retours des analyses chimiques du laboratoire d'analyse, ont été transmises aux différentes Fédérations Départementales. Il s'agissait surtout de valider le contexte de la masse d'eau et

de vérifier la bibliographie liée à la station et à son historique, certaines populations ayant déjà fait l'objet d'études génétiques il y a plusieurs dizaines d'années.

Sur 1256 barbeaux capturés, un seul individu a eu des difficultés à repartir après remise à l'eau (absence de recherche active d'un refuge, de l'obscurité), il s'agit d'un individu capturé en Lozère.

5.2. Analyses physico-chimiques

5.2.1. Mesures in-situ

Des mesures in-situ sont réalisées à chaque station et campagne. Les mesures de pH, de conductivités, de températures de l'eau, de l'air, les teneurs en oxygène dissous et le taux de saturation en oxygène sont réalisés à l'aide d'une sonde Hach Lange.

L'étalonnage des sondes est vérifié avant chaque campagne de prélèvement par le responsable du matériel. Si toutefois un doute persistait sur une mesure, elle était doublée avec la sonde de rechange.

Rappel sur le rôle des paramètres mesurés *in-situ* :

Le pH caractérise l'acidité du milieu. Il influe sur la forme des produits chimiques en conditionnant de nombreux équilibres chimiques et il est également un indicateur de l'activité biologique et plus particulièrement photosynthétique du milieu.

La température de l'eau joue un rôle fondamental dans les cycles de vie des espèces aquatiques : les êtres vivants ont un *preferendum* thermique (maximums et minimums au-delà desquels l'espèce disparaît) qui conditionne également certaines réactions chimiques avec le pH comme la dissociation gazeuse de l'azote ammoniacal NH_4^+ en ammoniac toxique NH_3 . On connaît cependant peu de chose sur le *preferendum* thermique du barbeau méridional (Tissot & Souchon 2010)

La conductivité donne une idée de la minéralisation globale de l'eau. Sa mesure permet d'avoir une image de la charge de l'eau en sels ionisés et de détecter certaines pollutions très importantes par des éléments non analysés par ailleurs. Une augmentation excessive de la conductivité entraîne une perturbation du milieu (elle influe sur la pression osmotique avec des problèmes de régulation chez les organismes aquatiques sensibles sténohalins).

L'oxygène dissous est indispensable à la quasi-totalité des organismes vivants (certains microorganismes peuvent vivre sans oxygène) et à la majeure partie des processus chimiques qui se produisent dans l'eau. Les besoins des différents animaux aquatiques varient selon les espèces et les étapes de leur cycle de vie. C'est un facteur écologique essentiel, sa présence (milieu aérobie) permet la respiration des êtres vivants et en son absence (milieu anaérobie) seuls certains micro-organismes subsistent. Le pourcentage de saturation exprime la quantité d'oxygène présente dans l'eau par rapport à la quantité totale d'oxygène que l'eau peut contenir à une température donnée. Les quatre principaux facteurs qui peuvent faire varier la teneur d'oxygène dissous dans les eaux sont :

- la température de l'eau : une eau fraîche contient plus d'oxygène dissous qu'une eau chaude,

- la turbulence du cours d'eau : un brassage important de l'eau augmente le contact de celle-ci avec l'air et par conséquent maintient le taux d'oxygène dissous proche de la saturation pour une température donnée,
- la consommation par les animaux, les plantes et de façon plus importante, par les bactéries qui dégradent la matière organique (les particules de plantes et d'animaux morts), diminue le taux d'oxygène dissous,
- la photosynthèse des plantes et des algues peut faire varier le taux d'oxygène dissous sur une période de 24 heures de la sursaturation à la sous-saturation, car le jour, les plantes produisent de l'oxygène alors que la nuit, elles en consomment.
- l'oxydation de la matière organique et de certains minéraux comme le fer et le manganèse

5.2.2 Mesures physico-chimiques au laboratoire

Des prélèvements d'eau ont été réalisés pour analyses au laboratoire CARSO sur 47 des stations étudiées. Le tableau II. Indique la liste les paramètres analysés.

Paramètres analysés	Unité de mesure
Orthophosphates – PO_4^{3-}	mg PO_4/l
Phosphore total – P	mg P/l
Azote ammoniacal – NH_4^+	mg NH_4/l
Nitrites – NO_2^-	mg NO_2/l
Nitrates – NO_3^-	mg NO_3/l

Les matières phosphorées :

Deux formes sont analysées dans les suivis de cours d'eau : les orthophosphates (ions PO_4) sont la forme la plus simple et la plus répandue des phosphates dans l'eau et le phosphore total (P_{tot}) qui cumule l'ensemble du phosphore organique et du phosphore minéral. Au-delà de 0,2 mg. L⁻¹, une présence importante de phosphates dans les eaux n'est pas naturelle et provient des déversements urbains (polyphosphates des lessives, excréments, dégradation de la matière organique) et des pratiques agricoles (engrais, épandages, écoulements de purin, etc..). Dans les cours d'eaux, les nitrates et les phosphates associés contribuent au développement excessif et anarchique des algues : l'eutrophisation des rivières.

Les matières azotées :

Dans l'eau, l'azote réduit soluble, se retrouve sous deux formes l'ion ammonium (NH_4^+) et la forme communément appelée ammoniaque (NH_3). L'ammonium (NH_4^+) n'est pas toxique, mais dans les eaux à pH supérieur à 7,5 une fraction peut être transformée en ammoniaque (NH_3) (gaz en suspension dans l'eau) qui est toxique pour les poissons. La présence d'ammoniaque dans l'eau à des concentrations même < 1 mg. L⁻¹ entraîne des

mortalités piscicoles surtout en milieux basiques. Par exemple pour les truites, la CL50 96 (Concentration Létale médiane sur 96 heures qui exprime la toxicité aiguë sur le poisson - mortalité de 50% des truites) n'est que de 0,4 mg. L⁻¹.

L'ion nitrate (NO₃⁻) est la principale forme d'azote inorganique trouvée dans les eaux naturelles. Il constitue le stade final de l'oxydation de l'azote. L'ion nitrite (NO₂⁻) s'oxyde facilement en ion nitrate et, pour cette raison, se retrouve rarement en concentration importante dans les eaux naturelles. Les principales sources de nitrates sont les effluents industriels et domestiques et le lessivage des terres agricoles. Des concentrations trop élevées de nitrites-nitrates peuvent être toxiques pour la faune aquatique et provoquer une maladie infantile (méthémoglobinémie). L'origine des nitrates dans les eaux est principalement agricole en raison du recours aux engrangements azotés, puis domestiques (rejets des stations d'épurations) avec la transformation de la matière organique en nitrates. Certaines stations peuvent être équipées d'un traitement de dénitrification avant rejet. En milieu naturel, les fortes concentrations en nitrates vont favoriser le développement des algues et l'eutrophisation des milieux.

Traçabilité du prélèvement au laboratoire :

Après avoir récupéré le flaconnage au laboratoire, il est convenablement étiqueté en accord avec les consignes du laboratoire afin d'assurer la traçabilité des échantillons du prélèvement jusqu'à l'analyse en laboratoire. Il sera mentionné à minima le code permettant d'identifier la station, la date et l'heure de l'échantillonnage. De plus, les fiches de prélèvements du laboratoire ont été soigneusement complétées.

Echantillonnage dans le cours d'eau :

Les échantillonnages ont été réalisés à pieds directement dans la veine principale d'écoulement des cours d'eau (à mi-hauteur de la colonne d'eau ou bien à 30 cm sous la surface), dans le cas d'un flaconnage sans agent de conservation.

Le technicien de la MRE a bien veillé à ne pas influencer la zone de prélèvement en se positionnant face au cours d'eau et en rentrant en aval de la zone d'échantillonnage.

Pour le flaconnage sans réactif, le rinçage des flacons a été réalisé en rejetant l'eau de rinçage en dehors de la zone d'échantillonnage. Le flaconnage a été rincé 3 fois avec l'eau de la station (flacon + bouchon) et les flacons sont remplis à ras bord (flacon refermé directement sous l'eau). Pour le flaconnage avec réactif, le remplissage a été effectué à l'aide d'un autre flacon afin d'éviter toute contamination du milieu naturel et dégradation de l'échantillon.

Afin d'assurer la norme COFRAC, l'eau a été directement filtrée sur le terrain à l'aide d'une seringue et d'un filtre.

Conservation et conditionnement des échantillons :



Dès que les échantillons sont prélevés, chaque flacon est hermétiquement fermé par son bouchon, parfaitement identifié et immédiatement réfrigéré.

Les prélèvements sont conservés à l'abri de la lumière et à une température de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, depuis le moment du prélèvement jusqu'à leur arrivée au laboratoire d'analyse. Le matériel de réfrigération (enceintes et blocs eutectiques) a été fourni par le laboratoire d'analyse.

La conservation a été vérifiée à la réception des échantillons et aucune anomalie n'a été observée.

Ceci nous a permis de préserver l'intégrité de l'échantillon (caractéristiques physiques, chimiques) depuis le prélèvement assuré par la Maison Régionale de l'Eau jusqu'à la réalisation de l'analyse par le laboratoire.

Organisation du transport des échantillons au laboratoire d'analyse :

Le transport des échantillons depuis le point de prélèvement vers le laboratoire a été assuré par le partenaire du laboratoire : TNT Express, spécialiste du transport express. Le Système de Management de la Qualité de TNT Express France est certifié ISO 9001.

A réception les échantillons ont été analysés et le délai entre le prélèvement et la mise en analyse a été respecté. Aucune anomalie a été identifiée lors de l'acheminement.

Les échantillons ont été traités dans les délais normatifs garantissant ainsi l'intégrité de l'échantillon et sa parfaite conservation.

5.3. Protocole ADN mitochondrial

Dans une première partie de l'étude, nous allons utiliser l'ADN mitochondrial. C'est un ADN qui est présent dans toutes les cellules d'individus mâles et femelles et plus précisément dans un organite que l'on appelle la mitochondrie (la centrale énergétique de la cellule). Alors que la majorité de l'ADN se trouve dans le noyau de la cellule (les chromosomes) et se compte en milliard de paires de bases, l'ADN mitochondrial est un chromosome circulaire de 17000 paires de bases. Cet ADN se transmet exclusivement par les femelles chez les vertébrés et présente un taux d'évolution modéré avec une moyenne d'une substitution sur l'ADN mitochondrial tous les 10 000 ans. De ce fait, il n'est pas influencé par la sexualité et les échanges mâle/femelle (recombinaison). On peut donc suivre, par les mutations observées (ou reconstituées), l'histoire évolutive d'une espèce et des populations qui la composent (Avise 2000).

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au gène mitochondrial du **cytochrome b** (1140 pb) qui est un marqueur moléculaire couramment utilisé pour étudier la structure génétique des populations de *Cyprinidae* (Kotlik and Berrebi 2001).

Afin d'obtenir la séquence de ce gène, nous avons utilisé le couple d'amorces LA-H1562 et séquencé dans un sens et dans l'autre 1192 pb. Cette double lecture de la séquence rend les résultats très sûrs.

5.4. Protocole Microbiome

Aujourd’hui le terme biodiversité prend en compte non seulement la structuration spécifique d’un écosystème mais aussi la diversité génétique de tous les individus, depuis la population, l’espèce jusqu’à l’écosystème. Depuis peu, à la diversité individuelle on associe, à juste titre, l’ensemble des communautés microbiennes qui vivent associées aux tissus de l’hôte en interaction neutre (commensales), bénéfique (symbiontes) ou pathogénique (pathogènes) formant un écosystème à l’échelle de l’individu et que l’on définit sous le terme de microbiome.

Ces communautés microbiennes associées à l’individu étendent très largement la diversité génomique et fonctionnelle de l’espèce. Le microbiome joue de multiples fonctions physiologiques essentielles au bon état de santé de son hôte tel que les défenses immunitaires, l’assimilation des nutriments et la dégradation de composés toxiques (Fuhrman, 2009). Cette association fonctionnelle étroite entre l’espèce et son cortège microbien est le résultat d’une longue histoire coévolutive, et constitue un potentiel d’adaptation aux changements rapides de l’environnement. (Bordenstein & Theis, 2015; Sevellec, Derome & Bernatchez, 2018; Simon *et al.*, 2019). Dans cette perspective, la définition d’unité de conservation, qui a pour objectif la préservation de processus évolutifs et la viabilité des populations d’espèce protégée (Fraser & Bernatchez, 2001), doit bénéficier de la caractérisation et de la diversité de la composition du microbiome. En effet la communauté microbienne associée au Barbeau méridional est une composante de la biodiversité de l’espèce, sa caractérisation apparaît alors importante dans la mise en œuvre des stratégies de conservation et des potentiels schémas de réintroduction future pour cette espèce menacée (West *et al.*, 2019; Trevelline *et al.*, 2019). Les communautés microbiennes sont présentes sur toutes les muqueuses du poisson (peau, branchies, intestins). A l’interface environnement-organisme, la composition du microbiome cutané du poisson est le reflet à la fois des conditions environnementales (pH, oxygénéation, eutrophisation, ...) et de l’état de santé de l’organisme (Boutin *et al.*, 2014). Le bactérioplancton est la source majeure des bactéries qui vont coloniser la peau mais l’état de santé du poisson notamment ses capacités d’activation du système immunitaire constitue un filtre des bactéries tolérées ou combattues. La caractérisation du microbiome cutané du B. méridional pourra être appréhendée comme un marqueur du bon état écologique des masses d’eau. Cette caractérisation doit notamment permettre la détection de déséquilibres de ces communautés microbiennes qui sont le reflet de situations de stress des individus/populations.

Le protocole moléculaire utilisé pour la caractérisation des communautés bactériennes associées à la peau (microbiome cutané) du barbeau méridional ainsi que celles présentes dans la colonne d’eau (bactérioplancton) est un protocole mis au point et validé au sein de notre laboratoire (Guivier *et al.* 2018). Ce protocole est identique pour les deux types d’échantillons afin de permettre leur comparaison pour un même site. Les différentes étapes comprennent l’extraction de l’ADN bactérien du tissu/filtre prélevé, l’amplification et le séquençage haut débit du barcode 16S identifiant chaque bactérie, le traitement informatique des données brutes, l’analyse et la caractérisation des communautés bactériennes.

La première étape a consisté à extraire, du tissu ou du filtre, l’ADN contenu dans les bactéries dont les parois doivent être lysées pour y accéder. Cette étape est réalisée par l’utilisation du kit d’extraction Mericon Qiagen. Ce protocole présente en outre l’avantage d’une extraction en quantité et en qualité de tout l’ADN, bactérien et poisson, permettant en

une seule procédure d'obtenir conjointement les échantillons ADN pour l'étude du microbiote cutanée d'une part et celle de la diversité génomique du barbeau d'autre part. Cette première étape a été réalisée par le prestataire ADN*ID* pour les 1256 tissus, et par le postdoctorant (E. Guivier) au sein du laboratoire pour ce qui concerne les 50 filtres correspondant aux stations pour lequel nous disposions des outils techniques pour réaliser un prélèvement du bactérioplancton.

La seconde étape a consisté à amplifier un fragment ADN, 251 pb du gène ARN ribosomique 16S, présent chez toutes les bactéries mais dont la séquence varie spécifiquement. Ce fragment ADN, ubiquiste et spécifique, constitue ainsi ce que l'on appelle « un barcode » permettant d'identifier chaque bactérie. Le séquençage haut débit de cette librairie ainsi produite et l'ensemble des amplifications, a été réalisé sur la plateforme GenSeq (G PTR Occitanie, labex CeMEB, Montpellier). Des témoins négatifs permettent de s'assurer de l'absence de contamination tout au long de ces 2 premières étapes.

La troisième étape est un traitement informatique des données brutes de séquençage. Brièvement, ce pipeline permet de réattribuer chaque séquence à chaque échantillon initial, de corriger les séquences erronées et d'attribuer chaque séquence corrigée à une identification bactérienne connue par l'intermédiaire de la base de données taxonomique SILVA en accès libre (<https://www.arb-silva.de/>). Nous obtenons ainsi une abondance relative de chaque variant bactérien, pouvant être identifié du phylum au genre, au sein de chaque communauté/échantillon.

Nous avons estimé la diversité alpha, indices Shannon et Diversité Phylogénétique (DP), de chaque échantillon. Nous avons ensuite estimé les dissimilarités entre les échantillons, diversité beta, suivant les indices Bray-Curtis et Jaccard qui tiennent compte respectivement des différences d'abondance relative et de la présence/absence de chaque variant. Nous avons également considéré l'indice unweighted Unifrac basé sur la détection de groupe phylogénique unique ou commun aux échantillons considérés.

La dernière étape est la caractérisation taxonomique des communautés bactériennes avec l'abondance relative des taxons qui les composent. Nous avons recherché spécifiquement la présence de bactéries pathogènes connues chez les poissons d'eau douce et responsables chez certaines espèces de lésions cutanées. Nous avons donc recherché dans le microbiome des populations BAM la présence de *Candidatus piscichlamydia* sp., *Candidatus branchiomonas cysticola* (Chlamydiales) et *Flaviobacterium columnare* (Flavobacteriaceae).

5.4.1. Le bactérioplancton :

Le prélèvement eau (500 ml) pour l'étude du microbiome aquatique libre est réalisé - en même temps que le prélèvement pour analyse physico-chimiques - avant le début de l'échantillonnage des populations barbeaux méridional et en milieu de colonne d'eau. L'échantillon est mis en stabulation dans le milieu aquatique pendant toute la durée de la pêche. En fin de pêche l'échantillon destiné à l'analyse du microbiome libre est filtré pour éliminer les matières en suspension (filtre 1,2µm puis filtre 0,22µm) ; le dernier filtre à 0,22µm est d'abord fixé dans l'alcool absolu puis conservé à -20°C jusqu'à extraction ADN.

5.4.2. Le microbiome cutané :

Le prélèvement d'un fragment de la caudale de chaque individu est stocké individuellement dans l'alcool absolu puis à -20°C. Afin d'optimiser le temps de prélèvement, pinces et ciseaux nécessaires au prélèvement de nageoire étaient utilisés que pour un seul poisson : en fin de station, les pinces et ciseaux sont plongés dans un bain d'eau de javel puis rincés à deux reprises et enfin séchés avant d'être remis en boîtes. De la même façon, la table est désinfectée en début et en fin de mesures et prélèvements.

5.5. Etude du génome nucléaire du *Barbus meridionalis*

5.5.1 Détection du polymorphisme nucléaire et séquençage des banques ADN

Nous avons choisi la méthode GBS (Genotyping By Sequencing : génotypage par séquençage) qui est une des approches dite de « séquençage de représentation réduite du génome » se basant sur l'utilisation d'enzymes de restriction afin de fragmenter le génome, permettant ainsi le génotypage de milliers de loci distribués aléatoirement dans tout le génome. Bien que d'autres marqueurs sont disponibles pour étudier le génome, les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism, Figure 1) constituent des marqueurs privilégiés puisque c'est la forme de variation génétique la plus abondante dans le génome. Ils sont stables, présents uniformément dans le génome et permettent d'analyser aussi bien la partie codante (gènes) que non codante (zone inter génique). Après fragmentation du génome, nous utilisons un séquençage paired-end qui permet de séquencer le brin d'ADN dans les deux sens en utilisant un séquenceur de type NovaSeq Illumina.

Ce type d'approche représente le premier choix lors des études d'hybridation et d'introgression génomique, puisque celles-ci peuvent être appliquées chez les organismes modèles comme non modèles (l'utilisation d'un génome de référence n'étant pas forcément nécessaire) (Nowak et al. 2020). La méthode GBS utilise une unique enzyme de restriction, ici *PstI*, afin de fragmenter le génome (Narum et al. 2013; Andrews et al. 2016). C'est une approche simple et rapide, spécifique et hautement reproductible pouvant atteindre tout type de régions du génome inaccessible aux approches de capture de séquences. De plus, c'est une approche efficace pouvant se substituer aux protocoles onéreux et complexes pour la découverte de marqueurs moléculaires (Elshire et al. 2011; Nunes et al. 2017). L'utilisation de marqueurs moléculaires permet d'obtenir, de manière rigoureuse, une estimation de la diversité génomique des espèces étudiées, estimer les flux génétiques au sein et entre les espèces étudiées, identifier la structure génétique des hybrides, et inférer l'histoire évolutive des espèces.

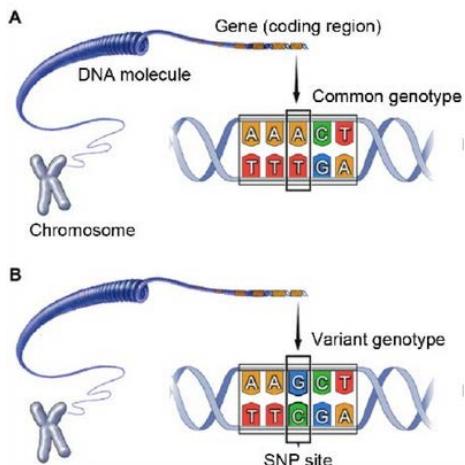


Figure 1. Description d'un SNP. A- la séquence d'ADN est AAACT/TTTGA B- la séquence d'ADN est AAGCT/TTCGA. Seule la troisième position de la séquence change, toutes les autres positions sont identiques.

5.5.2 Données disponibles

Pour étudier la structuration génétique de l'espèce *Barbus meridionalis*, nous avons disposons de deux jeux de données construits en utilisant le pipeline STACKS. Notre premier jeu de données nommé barbus_pr contient **1248** individus et **2770** SNP. Dans ce jeu de données, les SNPs sont construits à partir de séquences lues dans les deux sens (paired-end). Le second jeu de données nommé barbus_sg contient **1245** individus et **6060** SNP. Pour ce jeu de données, les SNPs sont obtenus à partir de séquences lues dans un seul sens. Les premiers résultats montrent qu'il existe de nombreux individus hybrides voire des populations hybrides issus de croisement entre *B. meridionalis* et *B. barbus*. Pour étudier la diversité génétique nucléaire des populations de *B. meridionalis* il faudra estimer précisément le niveau de « pureté » de chaque individu et garder uniquement les individus *B. meridionalis* purs. Ce travail de recherche n'a pu aboutir en raison du confinement.

6 Résultats :

6.1. Bilan des campagnes de prélèvements

L'étude ayant pour espèce modèle le barbeau méridional (BAM), notre effort a porté sur des stations de prélèvements où l'espèce est clairement identifiée, sur des stations dont la connaissance des populations représentait un enjeu de gestion et/ou conservation pour les différentes Fédérations départementales de Pêche et Protection des Milieux aquatiques (FDPPMA). Nous avons néanmoins cherché une station où l'on savait le barbeau fluviatile (BAF) bien représenté pour obtenir un « groupe extérieur », c'est le cas sur le Verdon à Vinon sur Verdon.

Des échantillons ont parfois été obtenus en un temps record, 15mn pour la station de l'Orsanne (Ardèche) ; d'autres fois l'échantillon de barbeaux nous attendait dans un bac de stabulation, la pêche ayant été effectuée, par l'équipe technique de la Fédération, pendant notre temps de déplacement (Réal Martin et Malaurie) dans le département du Var, celui des Htes Alpes ou bien encore de l'Hérault, parfois par l'AFB (Vaucluse) par exemple.

Les captures ont parfois été réalisées dans des endroits insolites, au milieu de barres de HLM dans le Var (l'Eygoutier), en aval immédiat de station d'épuration, (Ruisseau de Varages), dans les douves du château de Salses (Pyrénées orientales), en aval immédiat d'une résurgence alors que tout le cours d'eau est asséché (Station des Feuilla- Aude), dans « l'exutoire viticole AOC» de l'Aulin (Rhône), mais aussi dans des sites qui attirent un tourisme important (Isère, Haute Savoie, Alpes Maritimes, Lozère, Gard et Drômes).

Nous avons rencontré des difficultés. La sécheresse de l'été 2017 a réduit considérablement les débits et les surfaces mouillées et, ... les effectifs de barbeaux : des individus n'ont pas (ou peu) été capturés malgré un effort de pêche important (Jabron – Var, deux pêches négatives sur des stations distinctes dates 27 juin et 3 juillet), Aillade, un seul individu (Vaucluse, 19 juillet), le Largue (19 juillet 2018, Alpes de Hautes Provence), la Lozère (Gardon du Mialet, 28 juin, trois individus et Gardon de St Martin, 29 juin, trois individus également), enfin le Céans (Hautes alpes, 5 stations improductives plus une sur un affluent (le torrent de Sainte Cyrice), il faudra attendre la septième pêche- pour capturer 18 barbeaux). B. Tamagna (OFB 48), en recherche subaquatique, pendant le mois d'août, a pu identifier des barbeaux sur le Gardon St Jean, il nous a transmis l'information. Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps de repartir en Lozère, le programme était trop chargé. En revanche nous avons obtenu un échantillonnage de barbeaux sur le ruisseau des Rules affluent du Gardon de St Jean, mais dans le département du Gard.

Dans le cadre de l'étude, le ruisseau de l'Aillade avait été équipé d'un thermomètre aquatique (enregistrement horaire) et cette population située en amont d'une rupture de pente géologique importante (supérieure à 20m) qui interdisait une colonisation depuis l'aval, était intéressante à étudier (L. Guien, *information personnelle*).

D'autres fois encore, la présence de l'espèce en amont et en aval d'un seuil difficilement franchissable, a justifié d'un double échantillonnage : un échantillonnage amont et un échantillonnage en aval du seuil (Pyrénées orientales Tech-Bonabosc le 21 août et Beynon le 19 septembre dans les Hautes Alpes, par exemple). Il s'agissait alors de prendre en compte l'effet seuil

sur une hybridation possible de la population de *B. méridional* avec le *B. fluviatile*. En d'autres termes, le seuil existant évite-t-il une colonisation d'autres espèces depuis l'aval ?

Cette étude a justifié des déplacements beaucoup plus importants que ceux prévus initialement :

- Pour l'université, l'ensemble des campagnes représentent 5878 km effectué avec le Ford Transit DE - 175 - YF ou un Renault Kangoo DC - 760 - GG de l'administration (carnets de liaison- des véhicules administratifs), représentant- 60 journées de terrain, ce qui en soit ne représente qu'un aperçu, beaucoup de journées commençant à 6 :00 et se terminant après 22 :00.
- Pour la Maison Régionale de l'Eau l'ensemble des campagnes représente 11045 km et l'investissement dans le programme ECOBAM (terrain + administration + rédaction) représente 121 journées.

Nous avons ainsi obtenu 1256 barbeaux pour l'étude, soit 1218 individus capturés dans le cadre de l'étude (1193 identifiés visuellement BAM ou avec interrogations + 25 identifiés visuellement BAF) et 38 individus qui correspondent à des échantillons donnés.

La FDAAPPMA du Gard a souhaité nous confier, pour une analyse génétique, des échantillons prélevés par leurs soins sur des populations de *B. meridionalis* Il s'agit de 38 individus (25 individus du Vidourle à Cros et 13 individus du Vebron).

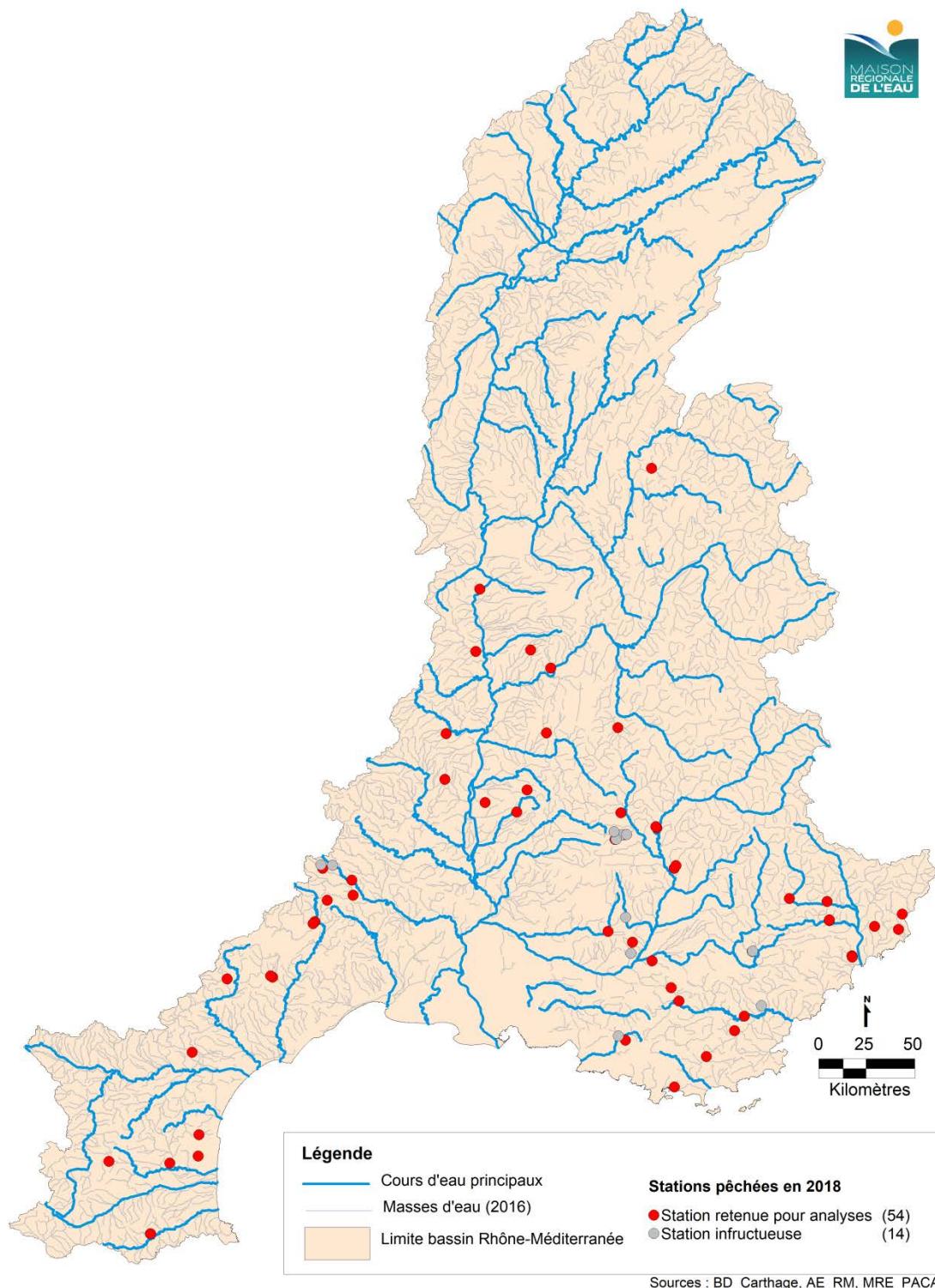


Figure 2. Carte et positions des stations étudiées

Tableau III. Résultats des pêches sur les stations prises en compte sur l'étude

CODE	département	N°	Cours d'eau	Date de la pêche	x en m	y en m	Altitude en m	Nbre de BAM	Biome	Génétique	Physico Chimie
AA	84	1	Calavon+Encreme	15/05/2018	906751,04	6310366,58	335	25	0	1	1
AB	83	2	Ruisseau de Varages	19/06/2018	939613,43	6281011,72	284	23	1	1	1
AC	06	3	Borrigo	25/06/2018	1058081,26	6311514,4	601	25	1	1	1
AD	06	4	Bévéra	25/06/2018	1060011,67	6319508,17	304	25	1	1	1
AE	06	5	Paillon de contes	26/06/2018	1045680,72	6313080,25	258	25	1	1	1
AF	06	6	Cians	26/06/2018	1020802,04	6325957,6	360	25	1	1	1
AG1	06	7	Estéron	27/06/2018	1021982,41	6316061,11	308	20	1	1	1
AG2	06	8	Cuëbris (Riou)	27/06/2018	1022000,78	6316412,99	313	8	1	1	0
AH	48	9	Gardon de St. Croix	28/06/2018	758087,39	6343285,4	348	20	1	1	1
AI	48	10	Ravin de la Dévèze	28/06/2018	757244,14	6345084,31	402	4	1	1	1
AJ	83	11	Floriye	03/07/2018	977751,05	6266236,74	50	26	1	1	1
AK	83	12	Riautort	05/07/2018	972703,8	6258685,18	70	25	1	1	1
AL	83	13	Réal Martin	05/07/2018	958031,11	6245224,1	84	26	1	1	1
AM	06	14	Cagnes amont	05/07/2018	1033829,91	6297750,19	37	8	1	1	1
AN	06	15	Cagnes aval	05/07/2018	1034001,83	6297103,8	29	17	1	1	0
AO	34	16	Lergue	10/07/2018	732056,08	6286560,04	82	18	1	1	1
AP	34	17	Rivernous	10/07/2018	730978,44	6287210,22	98	25	1	1	1
AQ	34	18	Clédou	10/07/2018	708371,87	6285621,85	280	25	1	1	1
AR	07	19	Cladégne	10/07/2018	821725,73	6389600,05	317	21	1	1	1
AS	07	20	Orsanne	11/07/2018	822402,31	6413515,31	316	25	1	1	1
AT	07	21	AY	11/07/2018	837836,23	6456288,03	251	25	1	1	1
AU	69	22	Aulin	11/07/2018	840021,01	6488842,31	154	25	1	1	1
AV	38	23	Merdaret	12/07/2018	876970,82	6447732,59	215	19	1	1	1
AW	38	24	Ebron	12/07/2018	911855,36	6416663,98	586	20	1	1	1
AX	74	25	Le Fornant	13/07/2018	929448,66	6551832,96	424	25	1	1	1
AY	74	26	Le Fornant	13/07/2018	929448,66	6551832,96	424	9	1	1	0
BB	04	27	Chaffère	19/07/2018	919445,08	63004720,58	337	8	1	1	0
BC	13	28	Les Encanaux	20/07/2018	915822,16	6253696,12	241	25	1	1	1
BD	83	29	Eygoutier	20/07/2018	941404,83	6229354,98	11	25	1	1	1
BE	83	30	Eau Salée	20/07/2018	943762,28	6274125,8	190	25	1	1	1
BF	30	31	Riéutord	26/07/2018	760492,83	6326694,18	505	7	1	1	0
BG	30	32	La Vis	26/07/2018	754073,42	6315576,43	154	16	1	1	1
BH	30	33	Crenze	27/07/2018	753164,94	6314501,54	165	25	1	1	1
BI	30	34	Ruisseau de Vabres	27/07/2018	773933,24	6329309,83	170	25	1	1	1
BJ	30	35	Ruisseau des Rules	27/07/2018	773270,3	6337079,96	226	25	1	1	
BK	05	36	Blèmes	09/08/2018	913484,76	6372204,91	722	25	1	1	1
BL	26	37	Lez 26	16/08/2018	859275	6372617	266	25	1	1	1
BM	26	38	Jabron26	16/08/2018	864562	6384172	411	25	1	1	1
BN	26	39	Rialle	16/08/2018	842772	6377621	161	25	1	1	1
BO	26	40	Herbasse	17/08/2018	866408	6457144	349	25	1	1	1
BP	26	41	Sepie	17/08/2018	874656	6413911	488	25	1	1	1
BQ	04	42	Ravin du Riou	20/08/2018	1001274,92	6327560,58	550	25	1	1	1
BR	83	43	Malaurie	20/08/2018	929700,68	6295086,59	299	25	1	1	1
BS	66	44	Bonabosc amont	21/08/2018	668449,03	6152814,13	385	21	1	1	0
BT	66	45	Bonabosc aval	21/08/2018	668518,02	6152829,64	380	21	1	1	1
BU	66	46	Boulzane	21/08/2018	646734,16	6190612,21	367	25	1	1	1
BV	66	47	Verdouble	21/08/2018	678502,18	6189663,3	87	25	1	1	1
BW	66	48	douves du château	22/08/2018	693278,23	6193358,34	7	18	1	1	0
BX	05	49	Céans	23/08/2018	910461,65	6358359,14	751	18	1	1	1
BY	04	50	Vançon Aval	27/08/2018	941178,97	6343292,47	485	25	1	1	1
BZ	04	51	Vançon amont	27/08/2018	942151,35	6344782,92	519	23	1	1	1
CD	11	52	Cesse	12/09/2018	690118,73	6247472,6	56	25	1	1	1
CE	11	53	Ruisseau de Feuilla	12/09/2018	693604,37	6204486,55	129	25	1	1	1
CF	05	54	Beynon aval	19/09/2018	93237,06	6364337,7	522	22	1	1	1
CG	05	55	Beynon amont	19/09/2018	931658,14	6365089,16	575	25	1	1	1
Σ								1193			
Pêches avec absence ou faible nombre de BAM (station sans échantillon)											
Id	département	N°	Cours d'eau	Date de la pêche	x en m	y en m	Altitude en m	Nbre de BAM	Biome	Génétique	Physico Chimie
NA	83	56	Nartuby	19/06/2018	986619,52	6271801,19	43	0			
JB1	83	57	Jabron 1	27/06/2018	981826,65	6299903,96	751	0			
JB2	83	58	Jabron 2	03/07/2018	982033,93	6300136,9	757	0			
GM	48	59	Gardon de St. Martin de Lansusle	28/06/2018	763255,11	6344904,51	324	3			
AZ	84	60	L'Aillade	19/07/2018	918743,28	6299002,01	348	1			
LA	4	61	Largue	19/07/2018	915948,95	6317808,14	491	0			
HU	13	62	Huveaune	20/07/2018	912180,5	6255931,57	170	0			
CE1	05	63	Céans 1	09/08/2018	913553,89	6360765,04	694	0			
CE2	05	64	Céans 2	09/08/2018	914938	6360675,24	677	0			
CE3	05	65	Céans 3	23/08/2018	916417,33	6360991,01	654	0			
CE4	05	66	Céans 4	23/08/2018	910950,9	6358526,83	743	0			
CE5	05	67	Céans 5	23/08/2018	910957,47	6358522,39	742	0			
CY	05	68	Torrent de Ste Cyrice	23/08/2018	909944,03	6362359,42	784	0			

Tableau III. Résultats des pêches sur les stations étudiées dans le cadre de l'étude ECOBAM

Echantillons hors programme									Biome	Génétique	Physico Chimie
Id	département	N°	Cours d'eau	Date de la pêche	x en m	y en m	Altitude en m	Nbre de BAM			
Ci	30	69	Vidourle à Cros	12/09/2018	766177,87	6322143,76	427	25		1	
CJ	30	70	Vebron	26/09/2018	795238,58	6349479,7	226	13		1	
CC	83	71	Verdon à Vinon	09/09/2018	925176,2	6295696,66	264	25		1	
		Σ						63			

Tableau IV. Résultats de pêches sur des stations surnuméraires.

Station Verdon à Vinon sur Vedon, recherche volontaire d'une station à *B. barbus*.

6.2. Qualité de l'eau :

Dans l'ensemble des paramètres, la couleur « bleue » est celle qui domine le tableau des résultats d'analyses (Classes de qualités pour l'Agence de l'Eau).

La qualité chimique de l'eau est en général bonne, même quand nous avons l'impression d'intervenir dans un milieu avec une odeur forte et un important dépôt de matières organiques et de limons sur le fond ; le dépôt se soulève à notre passage et entraîne d'importantes matières en suspension vers l'aval, la végétation de bordure est formée d'espèces nitrophiles. On note quelques valeurs plus fortes en nitrates supérieure à 10 mg/l, sur l'Aulin (20,3 mg/l), l'Ebron, le Fornant et le Chaffère, des valeurs élevées d'ammonium supérieures à 0,10 mg/l sur 9 stations avec une valeur maximale de 0,33 sur le Ravin de Riou (Alpes de Hte Provence), des valeurs élevées en orthophosphates 1,9 mg/l sur le Riau Tord (Var) et supérieures à 0,50 mg/l sur les stations Ay (Ardèche), Aulin (0,66 mg/l) et le Fornant (0,65 mg/).

La microbiologie est analysée à partir des espèces et groupes fonctionnels d'espèces présentes dans la masse d'eau quelques minutes avant de faire les prélèvements d'eau et la pêche électrique. Il sera intéressant d'étudier la répartition de quelques groupes que l'on sait pathogènes en fonction de la qualité physico-chimique de l'eau.

Tableau V. Résultats physicochimique sur les 47 stations de mesures.

Id	N° station	Dépt.	Cours d'eau	code sandre	Bilan de l'oxygène		Température en °C	Température de l'eau	Nutriments				pH	Conductivité en µS/cm
					Oxygène dissous	Taux de saturation en oxygène			mg/l NH4+	mg/l NO2-	mg/l NO3-	mg/l PO4-3-		
AA	1	84	Calavon+Endrôme	1505/18	9.21	98.1	11.9	<0.05	0.02	0.5	0.014	0.02	7.9	666
AB	2	83	Ruisseau de Varages	1906/18	8.83	93.3	18.7	<0.05	0.08	2.7	0.074	0.24	7.7	580
AC	3	6	Bourgo	2506/18	9.25	101.6	15.6	<0.01	<0.5	<0.5	<0.01	0.03	7.1	390
AD	4	6	Bévéra	2506/18	9.58	99.6	16.7	<0.05	<0.01	1	<0.01	0.03	7.3	1273
AE	5	6	Pailhon de contes	2806/18	9.55	106	16.6	<0.05	0.01	1.3	<0.01	0.03	7.3	371
AF	6	6	Cians	2806/18	8.85	102	21	<0.05	0.01	0.7	0.023	0.04	7.4	307
AGi	7	6	Estéron	2706/18	9.34	103.6	18	<0.05	<0.01	<0.5	<0.01	0.03	8.1	348
AH	8	48	Affluents les terres des	2806/18	8.8	99.8	18.7	<0.05	<0.01	0.6	0.01	<0.01	7.7	613
AH	9	48	Gardon de St Croix	2806/18	8.85	97.8	18	<0.05	<0.01	4.7	0.019	0.08	8.3	1012
AJ	10	83	Floriège	0307/18	9.2	100.3	19.3	<0.05	0.01	3.8	<0.01	0.03	8.3	634
AK	11	83	Rialmont	0507/18	8.58	98.4	22.7	0.08	0.05	5.1	0.618	1.9	8.6	934
AL	12	83	Réal Martin	0507/18	9.28	101.4	19.3	<0.05	0.02	6.3	0.018	0.06	8.1	695
AM	13	6	Cagnes amont	0507/18	9.19	99.6	17.9	<0.05	<0.01	1.4	0.011	0.03	8.4	363
AO	14	34	Lengue	1007/18	8.9	99.3	20.1	0.08	0.11	2	<0.01	0.01	8.1	628
AQ	17	34	Cleïdou	1007/18	8.2	99.5	22.3	0.09	<0.01	0.8	0.02	0.06	8.3	773
AR	18	7	Cledouge	1007/18	8.51	10.8	27.1	0.08	0.02	1.1	0.035	0.11	8.5	232
AS	19	7	Orsanne	1107/18	9.31	101.5	17.6	0.08	0.02	3.6	0.042	0.13	7.3	79
AT	20	7	L'AY	1107/18	8.94	105.4	22.1	0.08	0.16	2.6	0.17	0.52	8.5	116
AU	21	69	Aulin	1107/18	8.77	98.6	19.2	0.15	0.05	20.3	0.254	0.68	7.3	513
AV	22	38	Merdaret	1207/18	8.27	88.8	16.6	0.08	0.01	13.2	0.014	0.04	8.2	581
AW	23	38	Ebron	1207/18	8.82	103.4	20.8	<0.05	0.04	11.1	<0.01	0.01	7.6	342
AX	25	74	Le Fomart	1307/18	9.1	98	15.8	0.12	0.04	12.2	0.153	0.65	8.2	538
BB	26	4	Chaffière	1907/18	8.45	105.4	24.2	<0.05	<0.01	4.5	<0.01	0.01	8.1	658
BC	27	13	Les Encanaux	2007/18	8.07	90.9	19.5	<0.05	<0.01	1.3	<0.01	<0.01	8.1	469
BD	28	83	Eygoutier	2007/18	7.1	85.3	24.6	0.12	0.09	6.7	0.071	0.19	8.2	717
BE	29	83	Eau Salée	2007/18	10.4	120	20.7	0.26	0.23	3.9	0.086	0.24	8.6	4170
BF	30	30	Rieutord	2807/18	8.28	94.3	18.6	<0.05	<0.01	<0.5	0.014	0.03	8.0	997
BG	31	30	La Vis	2807/18	10.36	113.4	18.6	0.09	0.02	2.4	0.015	0.04	8.2	405
BH	32	30	Crème	2707/18	8.2	98.9	23.5	0.07	<0.01	0.6	0.023	0.07	8.2	734
BI	33	30	Ruisseau de Vabre	2807/18	9.24	100.9	18.6	0.07	<0.01	<0.5	<0.01	<0.01	8.0	680
BJ	34	30	Ruisseau des Rulles	2707/18	7.84	90.3	21.9	0.08	0.01	1	0.042	0.12	8.1	131
BK	35	5	Bièmès	0908/18	8.18	92.8	17.3	0.11	<0.01	0.7	0.038	0.03	9.1	380
BL	36	26	Lez 28	1808/18	8.7	95	18.7	<0.05	<0.01	1	<0.01	0.02	8.0	394
BM	37	26	Jabron28	1808/18	8.92	97.6	17.4	<0.05	<0.01	1	<0.01	0.02	8.0	482
BN	38	26	Riallie	1608/18	7.7	90.2	21.5	0.08	0.03	8	0.088	0.2	8.3	478
BO	39	26	Herbisse	1708/18	7.98	89.2	18	<0.05	<0.01	3.6	0.011	0.03	8.5	370
BP	40	26	Sepie	1708/18	9.5	111.2	20.1	0.05	<0.01	<0.5	<0.01	0.02	8.4	458
BQ	41	4	Revin du Rieu	2008/18	9.47	100.8	15.4	0.33	<0.01	1.3	<0.01	<0.01	8.1	272
BR	42	83	Malaunie	2008/18	9.34	101.4	21.3	0.13	<0.01	1.4	0.025	0.08	8.0	452
BT	44	66	Bonabosc aval	2108/18	7.3	85.6	21.3	0.07	<0.01	<0.5	0.035	0.09	8.3	193
BU	45	66	Boulane	2108/18	9.4	100.8	17.4	0.13	0.02	2.4	0.033	0.11	8.3	338
BV	46	66	Vérdouble	2108/18	8.2	92.8	17.3	0.16	<0.01	1.7	0.029	0.09	8.1	652
BX	48	5	Céans	2308/18	8.59	97.9	17.7	0.08	0.01	0.6	<0.01	0.02	8.2	353
BY	49	4	Vallon Aval	2708/2018	8.53	103.1	21.7	0.05	0.01	0.8	0.017	0.11	8.1	471
CD	51	11	Cesse	12/09/2018	7.2	92.6	22.5	0.07	<0.01	1	<0.01	0.01	7.4	587
CE	52	11	Ruisseau de Feuilla	12/09/2018	4.8	54.1	20.3	<0.05	<0.01	0.9	<0.01	<0.01	7.3	899
CF	54	5	Beynon aval	19/09/2018	8.4	98.8	19.4	<0.05	0.02	3.2	<0.01	<0.01	8.0	735

6.3. Résultats sur ADN mitochondrial

6.3.1. Répartition des populations de *B. meridionalis* et analyse par l'ADN mitochondrial

Notre étude porte sur 1256 spécimens échantillonnés sur 58 stations (carte google map, Annexe) représentant l'ensemble de l'aire de répartition du *B. meridionalis*.

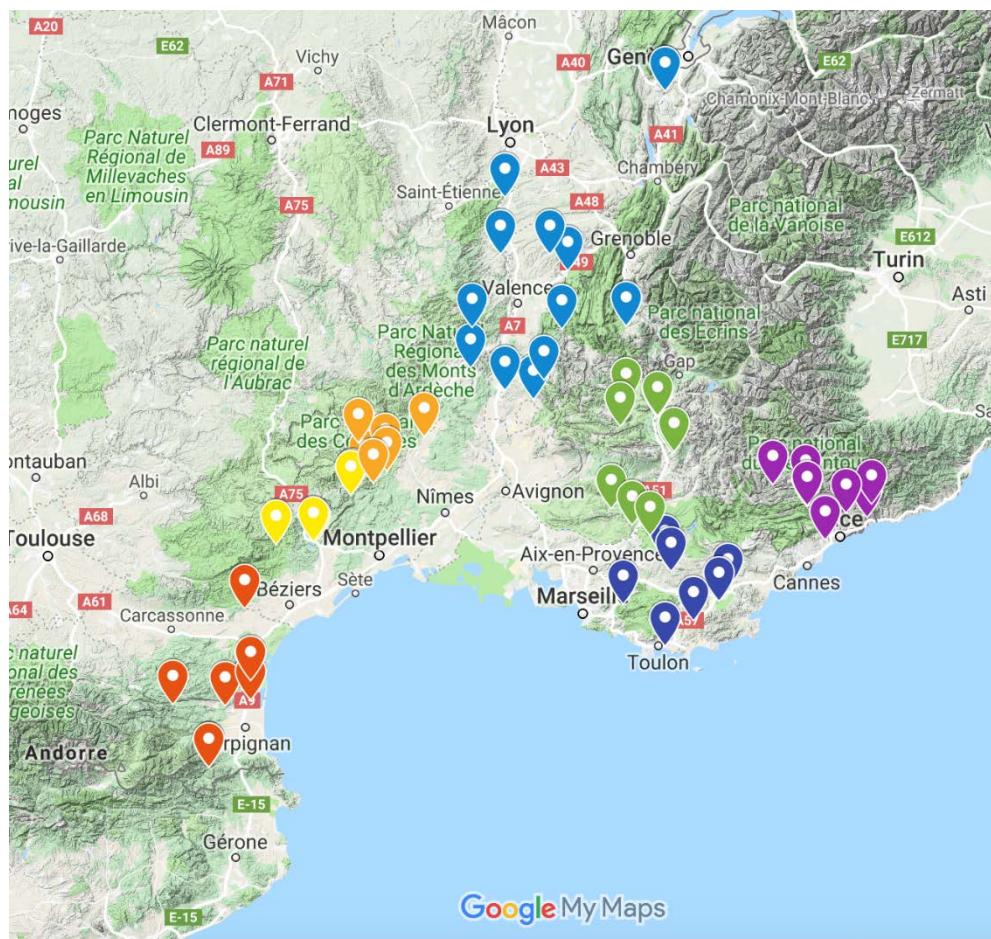


Fig. 3. Cartographie des stations étudiées par sous bassins versants.

Les couleurs correspondent à des zones hydro-géographiques actuelles que nous détaillons ci-dessous. Elles ne tiennent pas compte des basculements des rivières dans le passé. Ces basculements sont antérieurs ou concomitant de la dernière grande glaciation du Würm. Cette période glaciaire se décompose en deux grandes périodes de froid : le stade isotopique 4 qui va de -70 000 à -50 000 et le stade isotopique 2 de -30 000 à -10 000 qui vont avoir des conséquences sur les populations de poisson. Finalement, nous avons scindé notre jeu de données en 7 groupes :

- Violet : les Alpes maritimes qui regroupe les fleuves côtiers des Alpes maritimes.
- Bleu foncé : le Var qui regroupe les fleuves côtiers du Var et des Bouches du Rhône
- Jaune : l'Hérault qui correspond au Vidourle et au bassin de l'Hérault
- Rouge : Les Pyrénées orientales regroupent les fleuves côtiers du 66 mais aussi de l'Aude.

Le bassin du Rhône a été fractionné en trois entités le Gard, la Durance et une partie « supérieure » :

- Vert : la Durance qui correspond au bassin de la Durance
- Orange : le Gard qui correspond au bassin du Gardon
- Bleu clair : le reste du bassin du Rhône

6.3.2. Identification des individus *B. meridionalis* sur la base de l'ADN mitochondrial.

Nous avons trouvé 41 stations présentant exclusivement l'haplogroupe mitochondrial *B. meridionalis*, 3 stations présentant exclusivement l'haplogroupe mitochondrial *B. barbus* et 14 stations présentant les deux haplogroupes (Figure 3). Sur les 1256 spécimens analysés 1068 avaient un haplogroupe *B. meridionalis* et 188 un haplogroupe *B. barbus*.

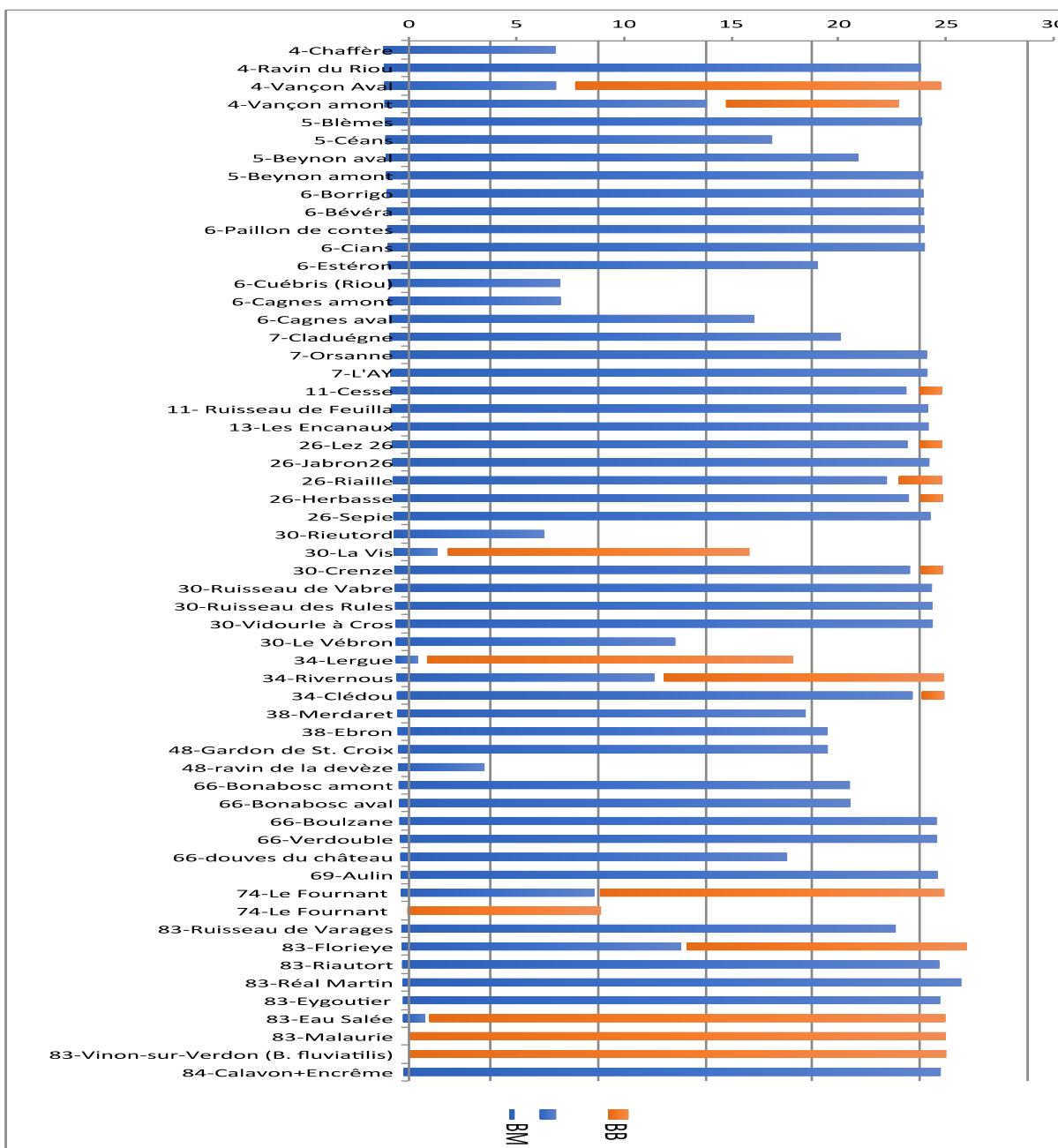


Figure 4. Nombre de *B. meridionalis* en bleu et de *B. barbus* en orange pour chaque station. (en ordonnée, nombre d'individus)

Lorsque l'on regarde de plus près les 14 populations (Figure 3) ayant les deux haplotypes, on constate que 6 populations ont plus de 90% d'haplotypes *B. meridionalis*, 2 populations avec moins de 10% d'haplotypes *B. meridionalis*, et 6 populations présentant de 12,5% à 65% d'haplotypes *B. meridionalis*. Cependant, nous ne pouvons pas dire si nous avons affaire à des cas d'hybridation (Crepin *et al.* 1999, 2002 ; Gettova *et al.* 2016) ou bien à une coexistence des deux espèces dans une même localité.

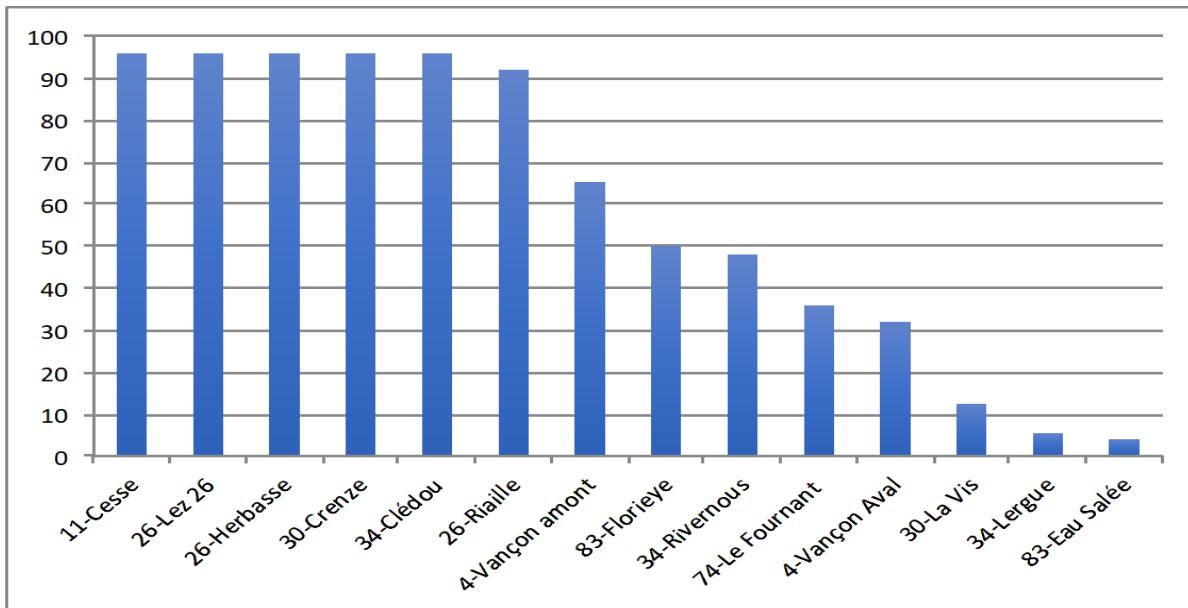


Figure 5. Pourcentage d'haplotype *B. meridionalis* dans les populations pour lesquelles nous avons détecté au moins un haplotype *B. barbus*.

6.3.3. Diversité génétique du *B. meridionalis*

Nous allons nous focaliser sur les 1068 séquences appartenant à l'haplogroupe *B. meridionalis*.

6.3.3.1. Réseau d'haplotypes

Nous avons construit un réseau d'haplotypes par la méthode du Median-Joining (Bandelt *et al.*, 1999) en utilisant le programme Network 4.6 (Fluxus Technology Ldt, www.fluxus-engineering.com). Nous avons identifié 30 haplotypes mitochondriaux (Figure 6). La structure du réseau en « étoile » est caractéristique d'une diversité mitochondriale récente des populations de *B. meridionalis*.

L'haplotype central (H_1), qui est partagé par l'ensemble des populations, peut être interprété comme l'haplotype ancestral (le plus ancien) à partir duquel se sont différenciés 29 haplotypes dérivés (H_2 à H_30) qui sont propres à des bassins hydrogéographiques voire des populations.

Parmi eux, 25 sont « à une substitution » (une différence avec l'haplotype ancestral), trois « à deux substitutions » (H_6, H_25, H_30), un « à trois substitutions » (H_17).

Seules 5 populations **AO** (Lergue-34), **BE** (Eau salée-83), **BY** (Vançon aval-04), **BZ** (Vançon amont-04), **CI** (Vidourle-30) ne possèdent pas cet haplotype ancestral (H_1), quant à la population **BW** (Douves château de Salses-66), un seul individu sur 18 présente l'haplotype H_1.

En revanche la population **CI** (Vidourle-30) possède exclusivement les haplotypes dérivés H_29 et H_30, **BY** et **BZ** exclusivement l'haplotype dérivé H_27 et **BW** l'haplotype dérivé H_26.

Attention les populations **AO** (Lergue-34) et **BE** (Eau salée-83) sont constituées d'un seul haplotype *B. meridionalis* aussi nous ne les analyserons pas dans le détail. **BE** partage l'haplotype H_14 avec **AX** (Le Fornant-74) et **AO** ne possède qu'un haplotype exclusif, l'haplotype H_8.

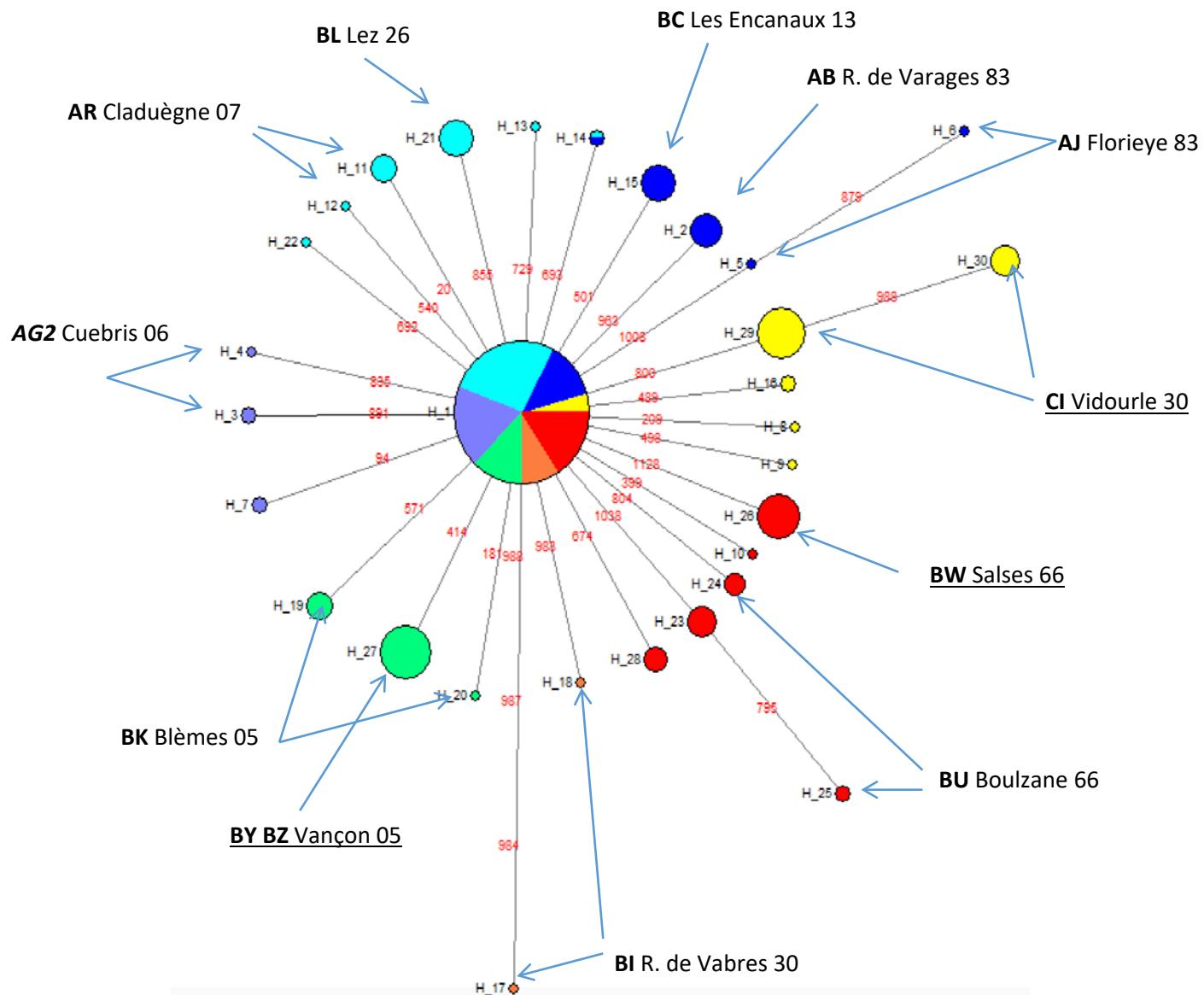


Figure 6. Réseau de 30 haplotypes effectués à partir des 1068 séquences de *B. meridionalis* (1140 positions) en utilisant la méthode du Median-Joining. Les disques représentent les différents haplotypes et la taille le nombre d'individus les constituant. Les couleurs représentent les bassins hydrogéographiques et le nom des stations suit la nomenclature du tableau IV.

(Violet : les Alpes maritimes, Bleu foncé : le Var, Vert : la Durance, Orange : le Gard, Bleu clair : le reste du bassin du Rhône, Jaune : l'Hérault, Rouge : Les Pyrénées orientales).

Lorsqu'un haplotype est partagé par plusieurs populations, les couleurs sur le disque montrent des surfaces proportionnelles au nombre d'individus de chacune des populations. Les nombres en rouge indiquent les positions des mutations sur la séquence et conduisant à l'haplotype.

- Les populations soulignées présentent exclusivement l'haplotype dérivé indiqué par la flèche.
- Les populations non soulignées présentent exclusivement l'haplotype dérivé indiqué par la flèche en plus de l'haplotype central (H_1). La population **AG2** (Cuébris-06) est une

population qui partage un haplotype dérivé avec une autre population, mais que nous indiquons ici suite à nos conclusions.

Indice de la diversité génétique des populations

31 populations sur 55 (56,36 %) ne présentent qu'un seul haplotype mitochondrial et sont donc monomorphes, 18 populations (32,73%) présentent deux haplotypes et 6 populations (10,91%) présentent trois haplotypes.

6.3.3.2. La diversité haplotypique (H)

La diversité haplotypique (H ; Nei 1987), qui est la probabilité de tirer au hasard deux allèles différents (deux haplotypes) appartenant à deux individus différents d'une même population est de 0 pour 31 populations. Pour les 24 (18+6) populations qui sont polymorphes la diversité génétique va de 0,08 (**AF** Cians-06, **AK** Riautord-83, **BM** Jabron-26) à 0,5181 pour la station **BL** (Le Lez-26), Fig. 6.

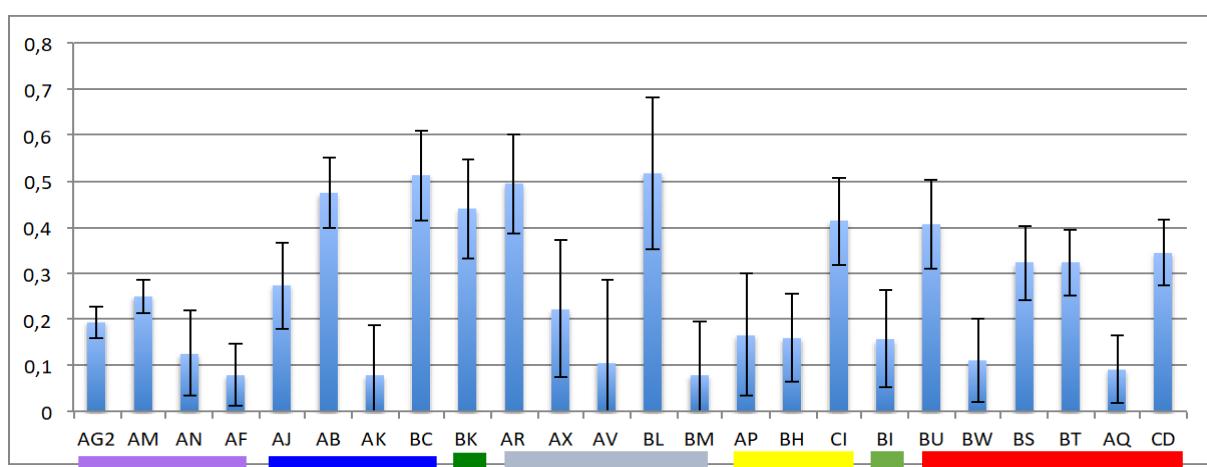


Figure 7. Diversité haplotypique (H) pour les 24 populations polymorphes sur les 55 populations étudiées. Les couleurs du réseau représentent les bassins hydro-géographiques (Violet : les Alpes maritimes, Bleu foncé : le Var, Vert : la Durance, Orange : le Gard, Bleu clair : le reste du bassin du Rhône, Jaune : l'Hérault, Rouge : Les Pyrénées orientales).

6.3.3.3. La richesse haplotypique (nrH) et le nombre d'haplotypes privés (npH)

Ces deux indices ont été calculés en utilisant le programme hp-rare version 1.0 (Kalinowski, 2005) en ré-échantillonnant 7 individus pour des tailles de population ayant un minimum de 7 individus (soit 90% des populations), 12 individus pour des tailles de population ayant au minimum 12 individus (soit 80% des populations) et enfin 18 individus pour des tailles de population ayant au minimum 18 individus (soit 70% des populations) respectivement **nrH7**, **nrH12**, **nrH18**, pour la richesse haplotypique et **npH7**, **npH12**, **npH18** pour le nombre d'haplotypes privés.

Comme nous l'avons dit précédemment, 31 populations sur 55 sont monomorphes. Ainsi leur valeur pour la richesse haplotypique est égal à 1, quel que soit l'échantillonnage (nrH 7, nrH 12, nrH 18). Le nombre d'haplotypes privés est égal à 0 si c'est l'haplotype H_1 et à 0,43 pour les populations BY et BZ (qui ont fixé exclusivement l'haplotype H_27). Aussi allons-nous discuter uniquement des populations polymorphes (2 et 3 haplotypes différents).

Pour la richesse haplotypique (Fig. 7) on constate à nrH7 que 6 populations ont au moins 2 haplotypes : AJ (Florieu-83), **BC** (Les Encanaux-13), BK (blèmes-05), AR (Claduègne-07), **BL** (Lez-26), BU (Boulzane-66). Pour nrH8 nous trouvons six populations qui dépassent strictement le seuil de 2 haplotypes, chacune d'elles dans un bassin différent (**AG2** (Cuébris-06), AJ (Florieu-83), BK (Blèmes-05), AR (Claduègne-07), **BI** (ruisseau de Vabres-30), BU (Boulzane-66)). Seul le bassin du Gard ne présente pas une telle population.

Cette différence s'explique par le fait que **AG2** et **BI** possèdent 3 haplotypes mais 2 d'entre eux sont inférieurs à 5% (de plus elles ont respectivement 20 et 25 individus).

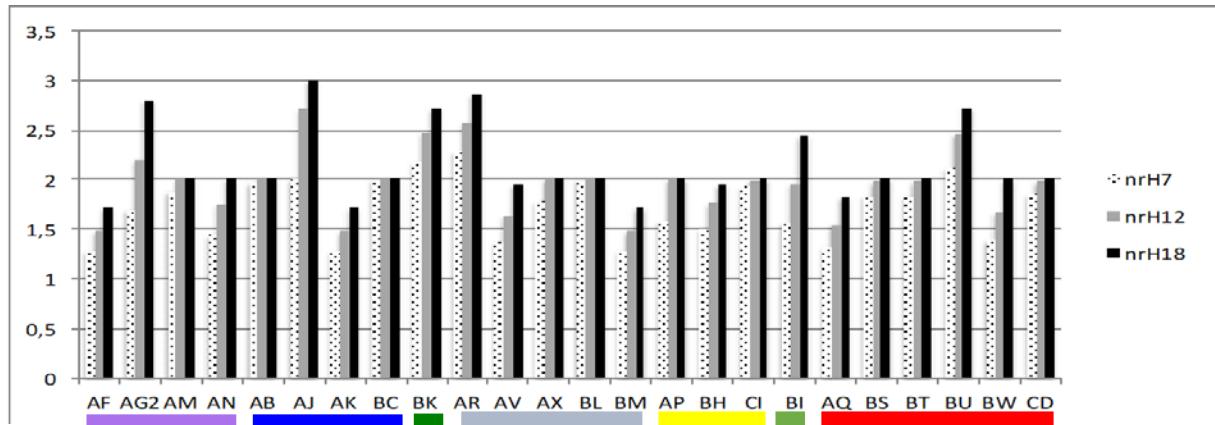


Figure 8. **Richesse haplotypique (nrH)** pour les 24 populations polymorphes ré-échantillonnées à 7 individus, 12 individus, 18 individus (respectivement nrH7, nrH12, nrH18). Les couleurs sur l'axe des abscisses représentent l'appartenance des populations aux bassins hydro-géographiques (Violet : les Alpes maritimes, Bleu foncé : le Var, Vert : la Durance, Orange : le Gard, Bleu clair : le reste du bassin du Rhône, Jaune : l'Hérault, Rouge : Les Pyrénées orientales).

Pour le nombre d'haplotypes privés (Fig. 8) on constate à **npH7** que 8 populations sont supérieures ou égales à 1 haplotype : AJ, **BC**, BK, AR, **BL** (Lez-26), CI, BU, **BW** (château de Salses-66). Pour **npH18** nous trouvons 7 populations qui dépassent strictement le seuil de 1 haplotype, chacune d'elles dans un bassin différent (**AG2**, AJ, BK, AR, CI, **BI**, BU).

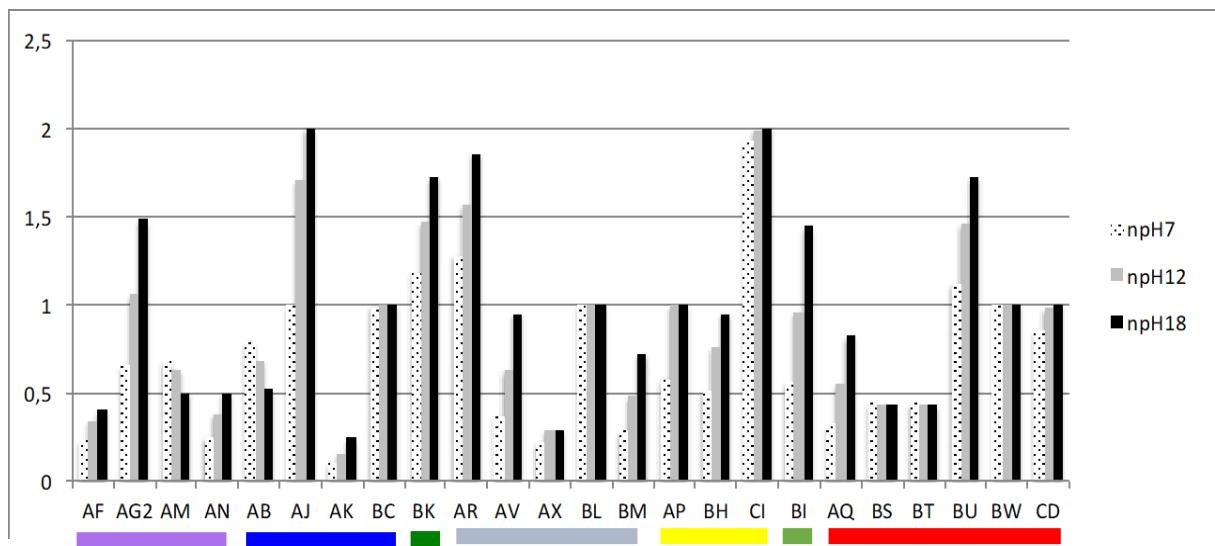


Figure 9. **Haplotypes privés (npH)** pour les 24 populations polymorphes ré-échantillonnées à 7 individus, 12 individus, 18 individus (respectivement npH7, npH12, npH18). Les couleurs sur l'axe des abscisses représentent l'appartenance des populations aux bassins hydro-géographiques (Violet : les Alpes maritimes, Bleu foncé : le Var, Vert : la Durance, Orange : le Gard, Bleu clair : le reste du bassin du Rhône, Jaune : l'Hérault, Rouge : Les Pyrénées orientales).

Finalement, si nous ramenons ces indices de diversité aux nombres de populations échantillonnées dans chaque bassin (tirage de 5 populations par bassin dont les effectifs sont de 18 individus par population), on constate que le Gard est le groupe le plus diversifié suivi des Pyrénées orientales et du Var (Fig. 10).

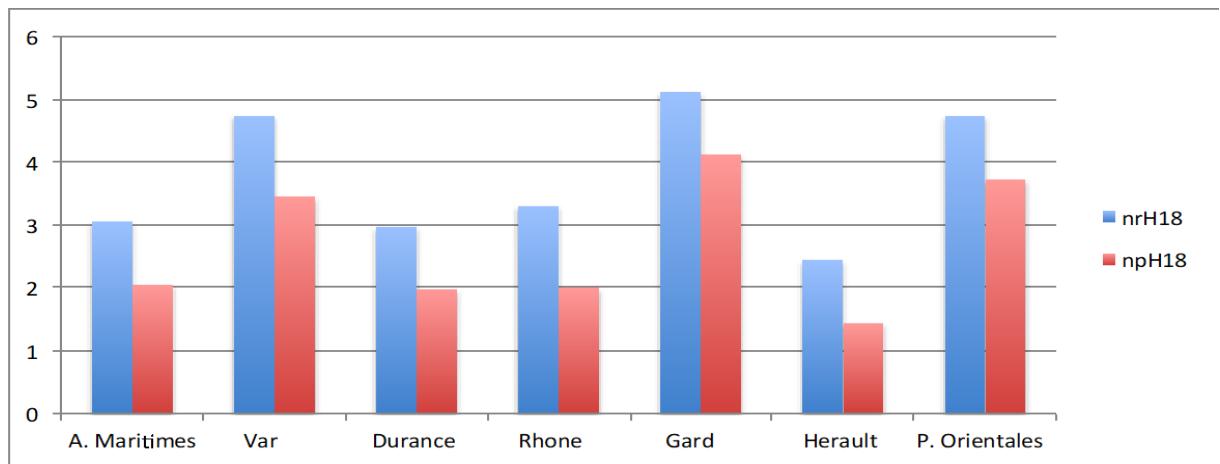


Figure 10. **Richesse haplotypique (nrH)** et **Haplotypes privés (npH)** pour les 55 populations ré-échantillonnées à 5 populations par bassin et 18 individus par population (respectivement nrH18 et npH18).

Nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- la richesse en haplotypes d'une population est essentiellement due à des haplotypes privés et ces haplotypes sont propres à des populations appartenant à des bassins hydrogéographiques différents.
- la diversité est la plus élevée dans le bassin du Gard et la plus faible dans le bassin de l'Hérault.

6.3.3.4. Evolution de la taille des populations au cours du temps

Nous souhaitons évaluer les fluctuations d'effectifs (*croissance versus effondrement*) des populations au cours du temps.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons comparé la distribution observée des différences par paire (entre deux haplotypes) sur l'ensemble du jeu de données à la distribution attendue sous un modèle d'expansion de population en utilisant le programme DnaSP 6.10.04 (Rozas *et al.*, 2017). Les deux distributions (Figure 11) montraient une forte adéquation avec un R² (Attention ce n'est pas le coefficient de détermination R² mais l'estimateur de Ramos-Onsins and Rozas, 2002) de 0,0064 (P<0,05) indiquant que les populations de *B. meridionalis* ont connu une expansion démographique récente. Ce résultat est confirmé avec deux autres statistiques (Fu et Li 1993, Tajima 1983) : le D de Tajima= -2,3094 (P<0,01) et le D* de Fu et Li=-4,3310 (P<0,02).

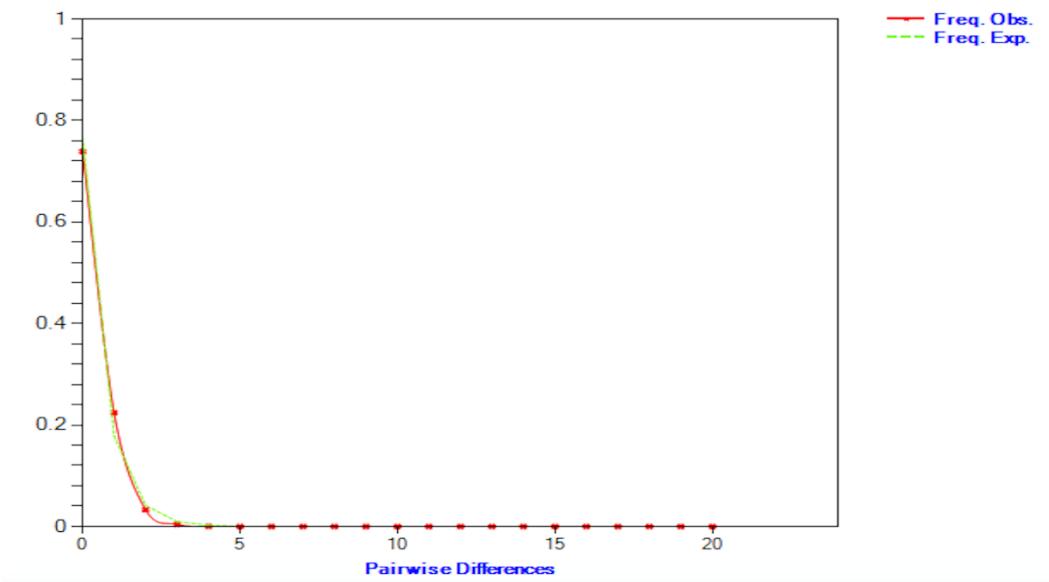


Figure 11. Distribution en mismatch portant sur les 1140 positions comparables du cytochrome b. L’axe des abscisses représente le nombre de différences entre deux séquences et l’axe des ordonnées les fréquences. La distribution théorique, utilisant un modèle d’expansion de population, est en vert et la distribution observée est en rouge.

6.3.4 Différenciation génétique des populations

6.3.4.1 Test de différenciation entre les populations

Il est intéressant de voir si la distribution des haplotypes se répartit aléatoirement suivant les populations (sous une hypothèse de panmixie, les individus se reproduisent aléatoirement entre les populations) ou pas. Ce test est analogue à un test exact de Fisher sur un tableau de contingence 2X2 étendu à une table de contingence contenant r populations et k haplotypes. L’ensemble des états possibles de la table de contingence est exploré à l’aide d’une chaîne de Markov. Puis on estime la probabilité d’observer une table de contingence moins vraisemblable que celle observée. Pour cela nous utilisons le logiciel Arlequin version 3.0 (Excoffier *et al.*, 2007).

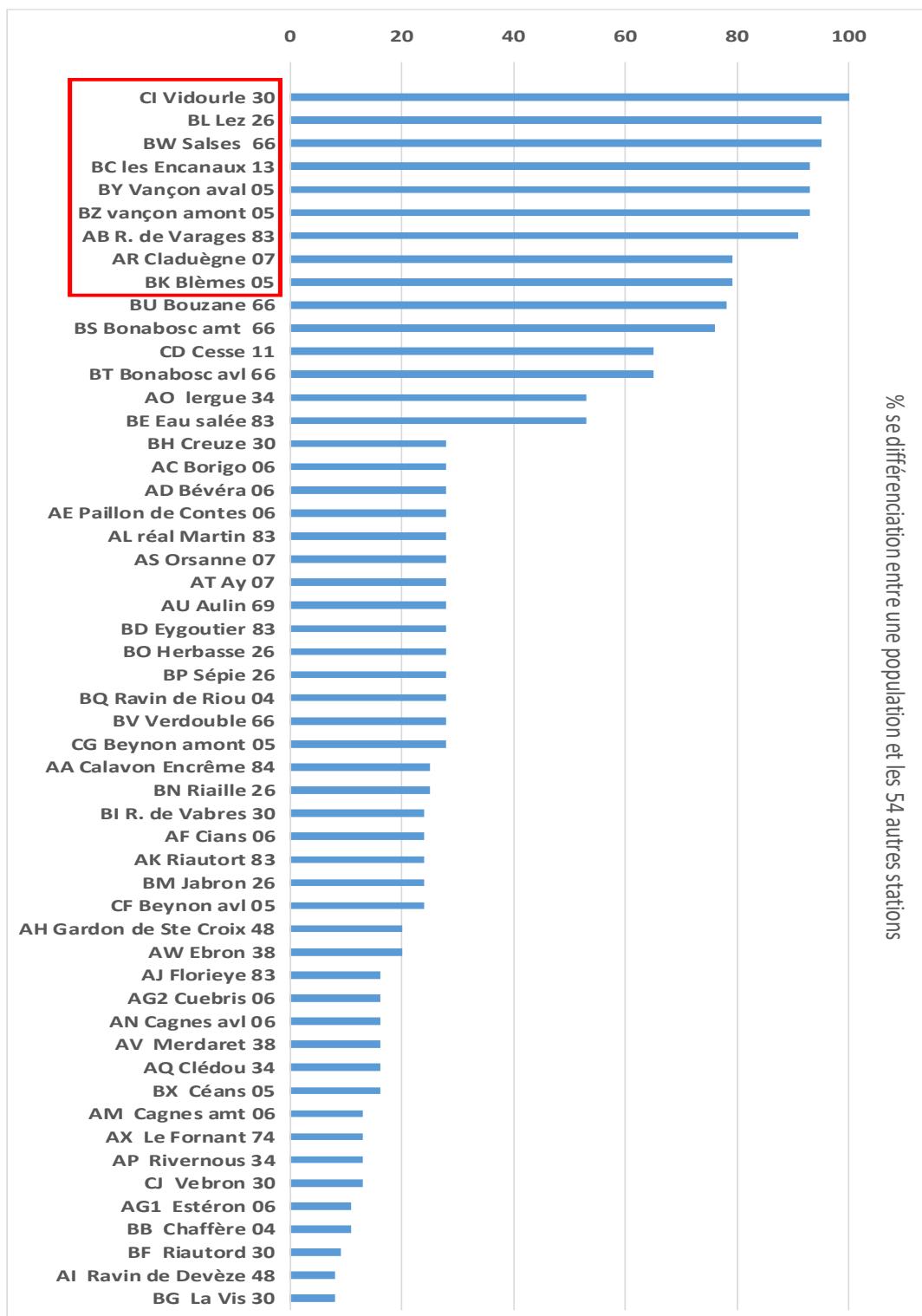


Figure 12. Répartition des 55 populations de *B. meridionalis* en fonction de leur différenciation avec les 54 autres populations. Si une population se différencie 54 fois elle a une valeur de 100% comme la population CI (Vidourle-30).

La Figure 12 nous montre que 7 populations (**CI** Vidourle-30, **BL** Lez-26, **BW** Salses-66, **BC** Les Encanaux-13, **BY** Vançon aval-04, **BZ** Vançon amont-04, **AB** Ruisseau de Varages-83) se différencient avec plus de 90% des autres populations et 2 de plus pour un seuil à 79% (**AR**

Claduègne-07, **BK** Blèmes-05). Ce sont des populations qui présentent exclusivement des haplotypes dérivés avec ou sans l'haplotype central (H_1).

6.3.4.2. L'indice de fixation Fst

Enfin nous nous sommes intéressés au brassage génétique entre les populations en utilisant les Fst calculées à partir du logiciel Arlequin version 3.0 (Excoffier *et al.*, 2007). Nous utilisons pour cela le Fst (Weir & Cockerham 1984) qui traduit les échanges génétiques entre les populations, c'est un index de **différenciation génétique entre populations**. Plus cette valeur est proche de 0 et plus les échanges génétiques sont importants entre les populations et la différenciation entre populations est faible, plus la valeur est proche de 1 et plus les échanges sont restreints donc la différenciation entre populations sera forte. On utilise empiriquement l'échelle suivante :

- $0 < \text{Fst} < 0,05$: différenciation génétique faible
- $0,05 < \text{Fst} < 0,15$: différenciation génétique modérée
- $0,15 < \text{Fst} < 0,25$: différenciation génétique forte
- $0,25 > \text{Fst}$: différenciation génétique très forte

La distribution des 1485 valeurs de Fst (soit $55 \times 54/2$ comparaisons, Figure 13) montre que 48,22% ont une différenciation faible, 12,79% modérées, 9,97% fortes et 29,02% très fortes. Ces résultats indiquent qu'il y a **une différenciation forte qui est due à une rupture des flux de gènes entre certaines populations**. Mais on constate aussi qu'il y a des populations qui ne se différencient pas ou peu, soit parce qu'elles échangent des individus, soit parce qu'elles ont hérité de la même composition haplotypique (dans notre cas posséder majoritairement l'haplotype central H_1).

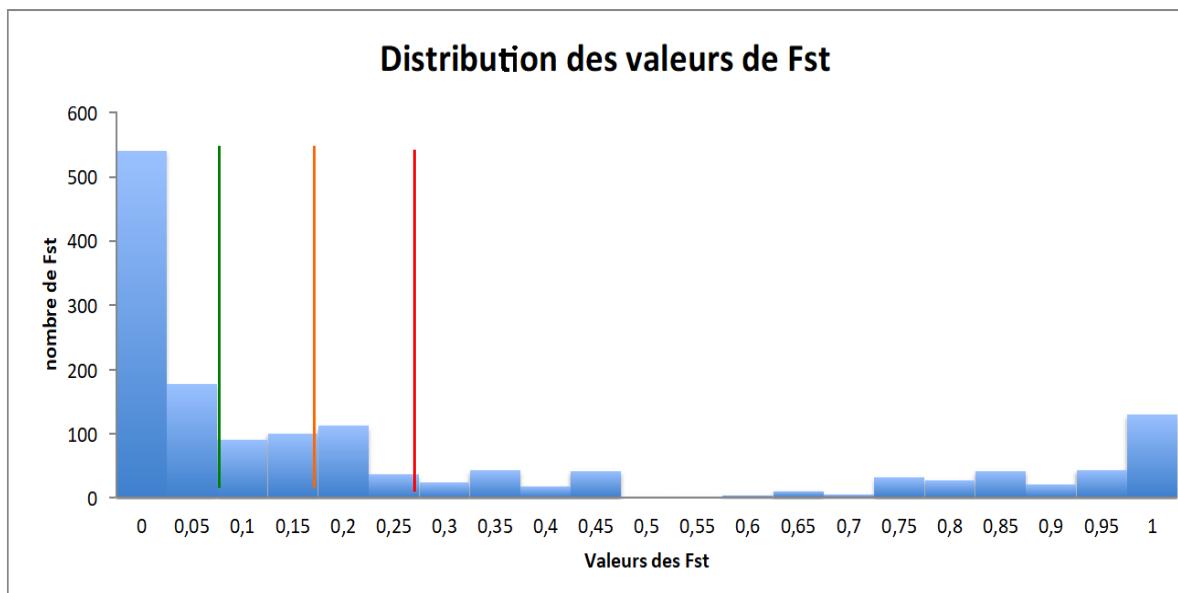


Figure 13. Distribution des 1485 valeurs de Fst (quantifie le brassage génétique entre paire de populations). Les valeurs en dessous du trait vert indiquent une différenciation faible, entre le trait vert et orange une différenciation modérée et au-delà de ce trait orange une différenciation forte (soit 39% des comparaisons).

6.3.4.3 Divergence génétique entre les populations

Nous nous sommes intéressés à la distance génétique entre les populations de *Barbus meridionalis* en utilisant une distance de Kimura deux paramètres (K2P). On constate que la

divergence génétique entre les populations est très faible allant de 0 à 0,0019. Ce sont les populations **BY/BZ** (Vançon amont et aval-04) *versus* **CI** et **BW** (Salses-66) *versus* **CI** (Vidourle-30) qui présentent cette plus grande divergence. Ces populations ne partagent aucun haplotype en commun, cependant ces haplotypes sont très proches génétiquement comme le montre la Figure 6.

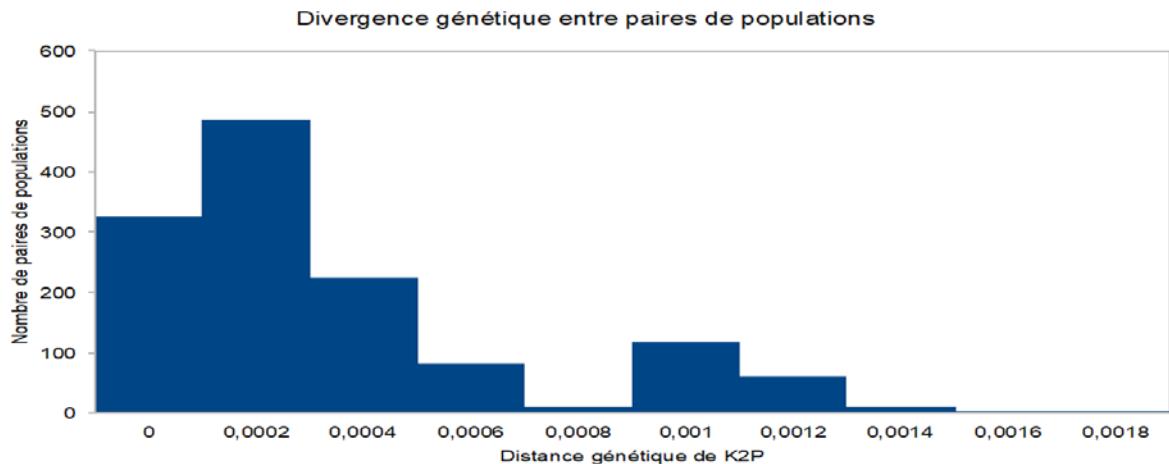


Figure 14. Distribution des distances génétiques (K2P) entre paire de populations de *B. meridionalis*.

6.4.4. Analyse moléculaire de la variance

Nous avons effectué une analyse moléculaire de la variance (AMOVA) afin de comprendre à quel niveau hiérarchique se situait la variation génétique. Nous avons choisi 3 niveaux :

- le premier niveau est la variation au sein de chaque population (les individus qui les composent ont le même haplotype ou pas)
- Le deuxième niveau est la variation entre les populations d'un même groupe géographique (les populations partagent les mêmes haplotypes ou pas).
- Le troisième niveau est la variation qu'il y a entre les groupes géographiques (partagent les mêmes haplotypes ou pas)

Un test portant sur 1023 permutations montre qu'il existe une différenciation génétique significative quel que soit le niveau hiérarchique (les trois variances Va, Vb et Vc ont une **P-valeur < 0,006**, voir **Tableau Amova**).

Le pourcentage de la variabilité génétique au sein des populations de *B. meridionalis* est dûe pour 45,27% à la variabilité des individus dans les populations, 48,92% à la différence entre les populations au sein d'un groupe géographique et 5,81% entre les groupes géographiques.

Ce qui veut dire qu'il y a :

- 1) des populations sont constituées d'individus ayant des haplotypes différents
- 2) à l'intérieur de chacun des groupes géographiques il y a des populations de barbeaux qui ont des haplotypes différents.
- 3) entre les groupes géographiques peu de différences car ils partagent essentiellement l'haplotype H_1.

Il y a donc des populations qui se différencient dans chaque groupe géographique :

- soit en ayant fixé un haplotype différent de l'haplotype le plus commun (H_1) et ces populations sont monomorphes.
- soit en ayant en plus de l'haplotype le plus commun (H_1), de nouveaux haplotypes et ces populations sont polymorphes.
-

Source de la variation	degrés de liberté	Somme des carrés	Composant de la variance	Pourcentage de variation
Entre les groupes	6	18,486	0,009	Va 5,81
Entre les populations à l'intérieur d'un groupe	48	72,507	0,07579	Vb 48,92
A l'intérieur des populations	1012	70,972	0,07013	Vc 45,27
Total	1066	161,965	0,15492	

Tableau VII. Structuration de la variation génétique. Les trois variances Va, Vb et Vc ont une P-valeur < 0,006.

6.4. Microbiome du Barbeau méridional

6.4.1 Echantillons considérés dans l'étude du microbiome

Dans le cadre de cette première partie, nous avons constitué pour l'étude du microbiome un sous-échantillon comprenant 571 tissus de nageoire caudale répartis sur 54 sites, ainsi que les 50 filtres d'échantillonnage de la colonne d'eau. Sur les 571 échantillons, l'étude phylogénétique a permis d'identifier 468 spécimens appartenant à la lignée Barbeau méridionale et 103 à la lignée Barbeau fluviatile. Basé sur cette analyse phylogéographique nous avons regroupé les sites et analysé la diversité microbienne suivant les 7 bassins distincts : Alpes Maritimes, Durance, Gard, Hérault, Pyrénées Orientales et Rhône, Var.

Le séquençage MiSeq de la librairie rRNA 16S correspondante- à ces échantillons comprend après traitement informatique 5 469 520 séquences. Pour des raisons techniques, dont le prestataire n'a pu donner d'explication, une duplication de ce processus a échoué. Ainsi la faible profondeur du séquençage n'a permis de retenir que 377 échantillons BAM répartis sur 37 sites et 49 filtres d'eau pour lesquelles nous disposons d'au moins 3000 séquences.

6.4.2. Diversité et Composition du Bactérioplancton

Sur les 49 échantillons d'eau considérés pour lesquelles nous disposons de données suffisantes, nous estimons une diversité Shannon du bactérioplancton comprise entre 1,39 et 6,82 et une Diversité Phylogénétique (DP) comprise entre 4,28 et 32,80. Cette diversité est extrêmement variable entre sites mais nous ne détectons pas de variation significative suivant le regroupement des sites par bassin (Shannon, Anova, $F=0,718$, $p=0,64$; DP., Anova, $F=1,59$, $p=0,17$; Figure 15).

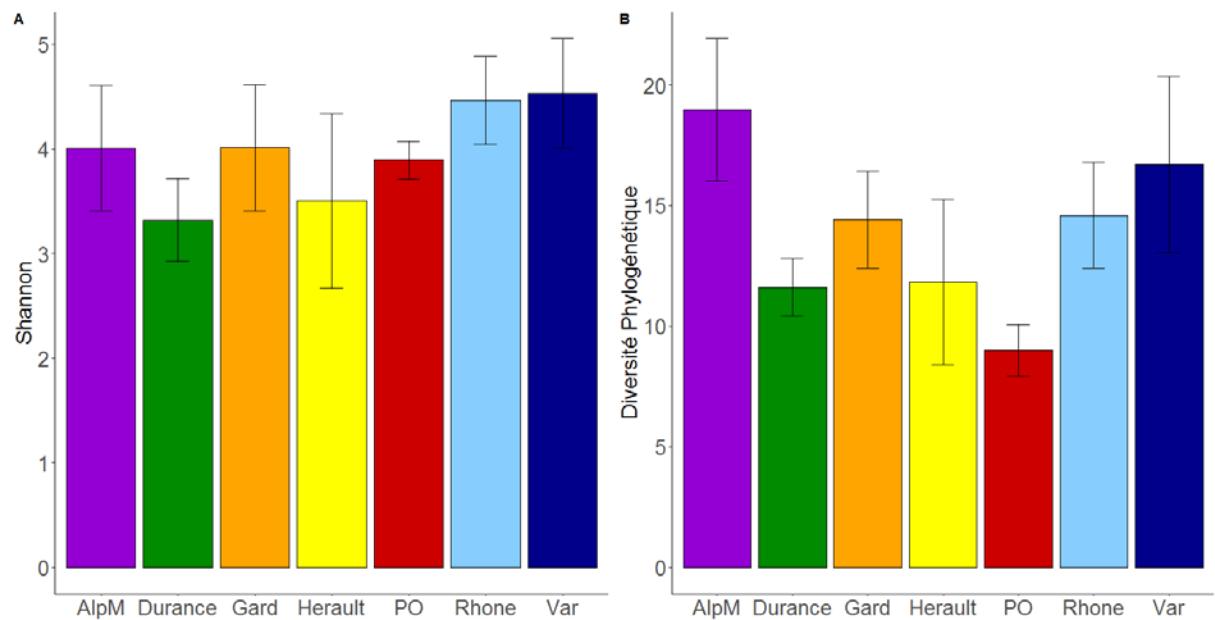


Figure 15. Diversité alpha, Shannon et Diversité Phylogénétique, du bactérioplancton échantillonné dans la colonne d'eau pour chacun des site et regroupés par bassins. Chaque barre correspond à la valeur moyenne estimée par bassin. (+/- écart type)

Chacun des sites échantillonnés a également été décrit suivant des paramètres physico-chimiques par un prélèvement de la colonne d'eau (cf paragraphe MRE). Nous pouvons donc décrire la variabilité des sites sur l'ensemble des paramètres estimés, physico-chimiques et bactérien (Shannon, DP et nombre de variants bactérien observés), par une analyse en composante principale (ACP). Nous ne considérons pas le paramètre « saturation en oxygène » redondant avec le paramètre « oxygène dissous », ni le paramètre « Orthophosphate » redondant avec le paramètre « Phosphore total ». Le jeu de données comprend 42 sites, 9 variables actives (physico-chimie de l'eau) et 3 variables supplémentaires (diversité du bactérioplancton).

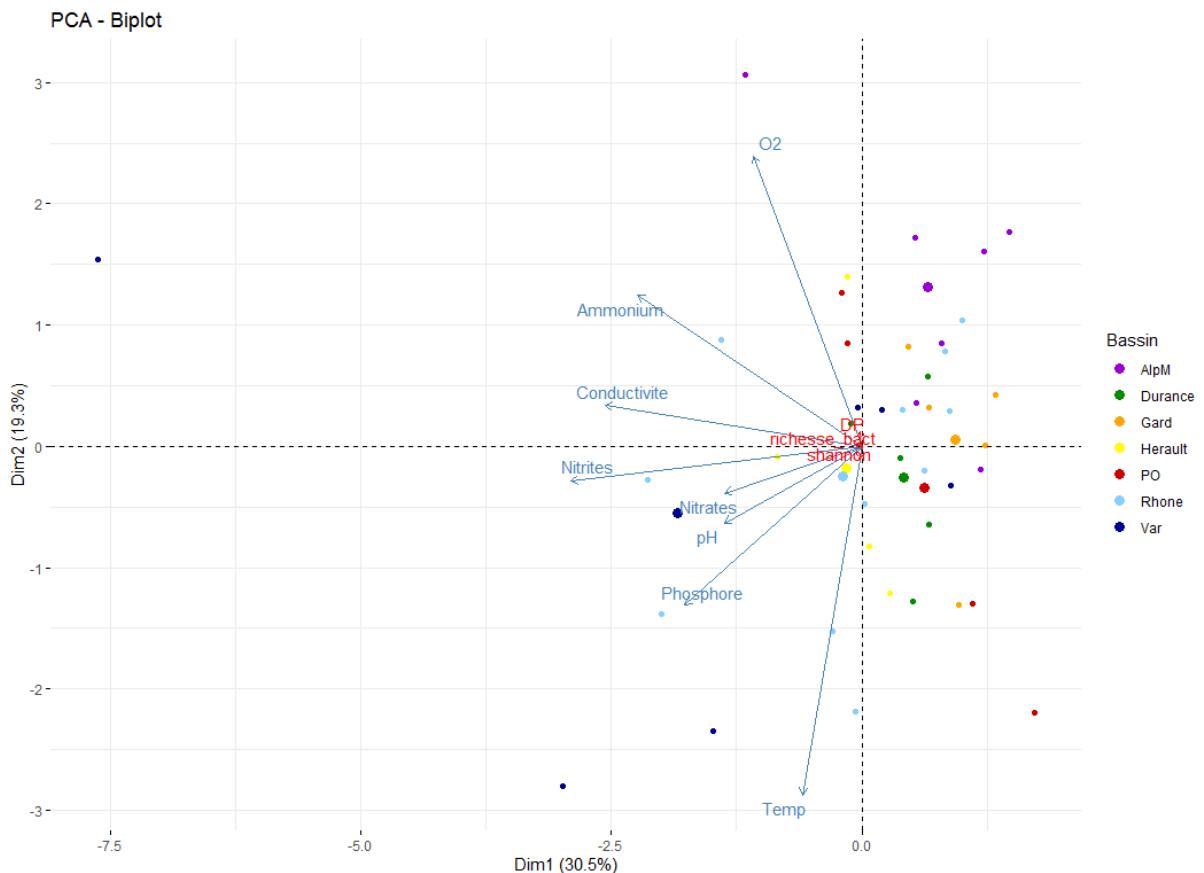


Figure 16 Analyse en Composantes Principales (ACP) sur les paramètres physico-chimique et bactérien de l'eau. L'ACP est réalisée sur les variables physico-chimique et les estimateurs de diversité bactérienne sont représentées comme variables supplémentaires en rouge. Les deux premiers axes de l'ACP représentent respectivement 30,5% et 19,3% de la variabilité totale du jeu de données. Les variables actives sont la concentration des Nitrites (Nitrites), Nitrates (Nitrates), Ammonium (Ammonium), Phosphore total (Phosphore), Oxygène dissous (O2), température (Temp), pH (pH) et les variables supplémentaires (rouge) sont la diversité Shannon (shannon), Diversité Phylogénétique (DP) et nombre de variants bactérien observés (richesse_bact). Chaque point correspond à un site, pour chaque bassin le barycentre est représenté par un point de plus grande taille.

Les deux premiers axes de l'ACP, PC1 et PC2, représentent 30% et 19% de la variation totale du jeu de données. Globalement, la distribution de la majorité des échantillons proche de l'origine du plan formé par les axes PC1 et PC2 confirme une faible variabilité des paramètres physico-chimiques entre sites, déjà suspectée préalablement à la vue de l'homogénéité des données du tableau VI. L'axe PC1 discrimine les sites principalement suivant la conductivité et la concentration en nitrites. L'axe PC2 est positivement corrélé à la concentration en oxygène dissous et négativement à la température. Sur l'axe PC1 seuls quelques sites dans le Var sont fortement

discriminés en lien avec des valeurs élevées de conductivité et de concentration en nitrites, c'est le cas en particulier du site « Eau salée ». Sur l'axe PC2 les sites sont répartis plus graduellement indiquant les variations observées de la température et d'oxygénéation des cours d'eau. Les sites dans les Alpes Maritimes sont corrélés positivement à la concentration en oxygène dissous et négativement à la température. Température et oxygène dissous sont toujours corrélés négativement.

En positionnant les estimateurs de diversité du bactérioplancton sur ce plan nous n'observons pas de lien avec la répartition des sites suivant les paramètres physico-chimiques de l'eau. Pour étudier la diversité beta du bactérioplancton des habitats du BAM, nous réalisons une analyse en coordonnées principales (PCoA) pour les indices : Bray-Curtis, Jaccard et unweighted unifrac. L'analyse ne révèle pas de structuration géographique de la composition bactérienne des cours d'eau quel que soit l'indice considéré (Figure 16). Au contraire nous observons une très forte disparité au sein de chaque bassin géographique suggérant que la composition bactérienne résulte de multiples facteurs environnementaux spécifiques de chaque cours d'eau.

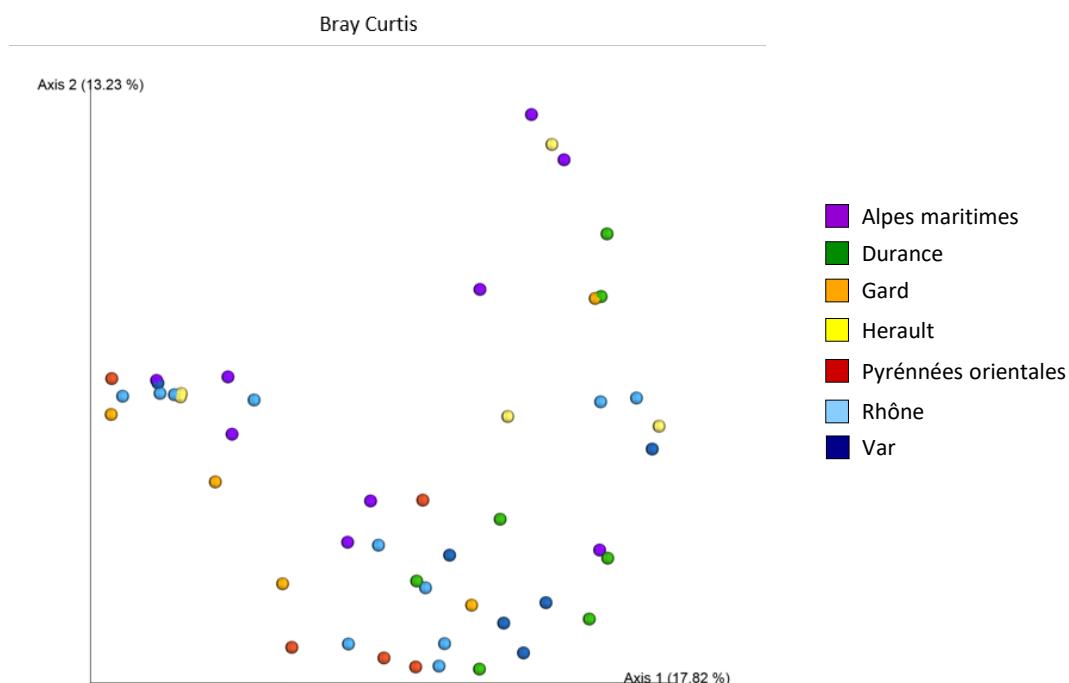


Figure 17 Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) sur les matrices de dissimilarités Bray-Curtis des compositions bactériennes. Les deux premiers PCoA1 et PCoA2, sont représentés et correspondent à 17,8 % et 13,23% de la variation totale. Chaque point représente un site dont la couleur correspond au bassin de regroupement

Les données obtenues permettent une caractérisation taxonomique du bactérioplancton pour chacun des cours d'eau. Nous observons déjà au niveau du phylum, le plus haut niveau taxonomique, une forte variabilité entre bassins et sites (figure 18) et en particulier avec les trois principaux phylums : Proteobacteria (9-89%), Bacteroïdetes (1-87%) et Actinobacteria (0-43%). Cette composition du bactérioplancton est comparable aux écosystèmes lotiques des latitudes tempérées (Craaud *et al.*, 2019). Le phylum Proteobacteria comprend le genre *Rhodoferax* que l'on retrouve fréquemment dans des eaux stagnantes exposées à la lumière. Le phylum Bacteroïdetes comprend notamment le genre *Flavobacterium* dont certaines espèces sont pathogènes chez les poissons d'eau douce et le genre *Pseudarcticella* caractéristique de milieu aquatique aérobie. Le phylum Actinobacteria comprend majoritairement le genre *Rhodoluna*, une bactérie non mobile de

la colonne d'eau, et le genre *hgcl* clade (*Sporichtyaceae*), bactérie commune en période d'été et se développant à partir de la dégradation de matière organique (Craaud *et al.*, 2019). On note également l'abondance du phylum Patescibacteria (0-37%), comprenant pour la plupart des bactéries se développant dans des environnements anoxiques.

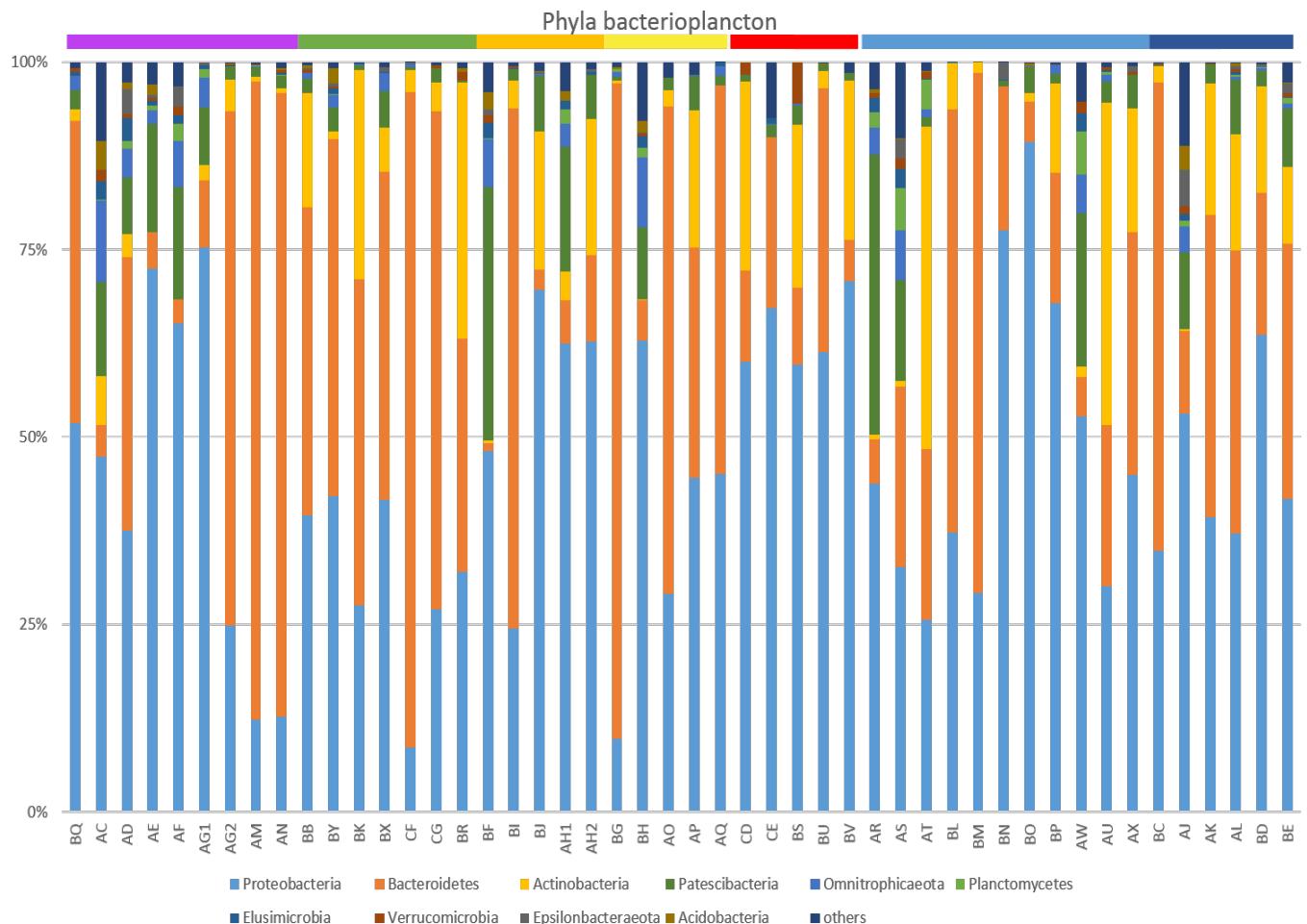


Figure 18. Abondance relative des phylums bactérien dans la colonne d'eau pour chaque site. Les 10 phylums les plus abondants dans l'ensemble du jeu de données sont représentés, les autres phylums étant regroupés sous le terme « others ».

6.4.3. Diversité et Composition du Microbiome cutané

Nous avons estimé la diversité alpha du microbiome cutané de BAM dans chacun des sites. Nous avons recherché l'existence de liens entre cette diversité microbienne des barbeaux et la description physico-chimique des cours d'eau dans lesquelles ils vivent. Pour ce faire, nous avons considéré la valeur moyenne par site des indices Shannon, DP et richesse bactérienne par site. L'ACP comprend 34 sites, 9 variables actives (physico-chimie de l'eau) et 3 variables supplémentaires (diversité du microbiome cutané des populations de BAM).

Les deux premiers axes représentent respectivement 30% et 19% de la variation totale. L'axe PC1 est corrélé aux concentrations des éléments nitrates, nitrites, phosphore et ammonium. L'axe PC2 est corrélé positivement à l'oxygène dissous et négativement à la température et au pH. Comme

précédemment, on note globalement une répartition des sites proche de l'origine des axes indiquant une relative faible variation des paramètres physico-chimique entre sites. La répartition des sites est portée par l'axe 1 à l'exception de quelques sites dans le Rhône et le Var. On retrouve sur l'axe PC2 les sites des Alpes maritimes positivement corrélés à l'oxygénation et négativement à la température et au pH. Les estimateurs de diversité du microbiome du BAM sont faiblement corrélés avec la position des sites le long de l'axe PC1 caractérisés par la concentration en éléments azotés et le phosphore totale. Nous concluons que la diversité du microbiome des populations BAM n'est que très faiblement liée à la description des sites suivant les paramètres physico-chimiques de l'eau.



Figure 19. ACP sur les paramètres physico-chimique et du microbiome cutanée du barbeau. L'ACP est réalisée sur les variables physico-chimique et les estimateurs de diversité bactérienne sont représentées comme variables supplémentaires en rouge. Les deux premiers axes de l'ACP représentent respectivement 30,7% et 19,6% de la variabilité totale. Les variables actives sont la concentration des Nitrites (Nitrites), Nitrates (Nitrates), Ammonium (Ammonium), Phosphore total (Phosphore), Oxygène dissous (O₂), température (Temp), pH (pH) et les variables supplémentaires (rouge) sont les valeurs moyennes par site de la diversité Shannon (shannon), Diversité Phylogénétique (DP) et nombre de variants bactérien observés (richesse_bact).

Nous ne détectons pas de corrélation entre le microbiome cutané et le bactérioplancton ni pour l'indice de Shannon ($R=0.04$, $p=0.84$) ni pour l'indice de Diversité Phylogénétique ($R=-0.07$, $p=0.72$). Ces résultats suggèrent que le développement bactérien dans chacune de ces composantes, i.e. eau et muqueuse cutanée, est soumis à des contraintes environnementales différentes. Ce résultat est confirmé par l'analyse de la dissimilarité de la composition bactérienne du bactérioplancton et du microbiome cutané. Nous observons une très nette différenciation en particulier pour l'indice unweighted Unifrac basé sur la présence de groupes phylogénétiques spécifiques ou communs à chaque communauté (Figure 20). Ces résultats suggèrent que seuls certains groupes

phylogénétiques sont capables de coloniser la peau. Ils suggèrent ainsi également des processus sélectifs importants liés à des fonctions bactériennes mais aussi à des mécanismes immunitaires de tolérance/résistance du poisson.

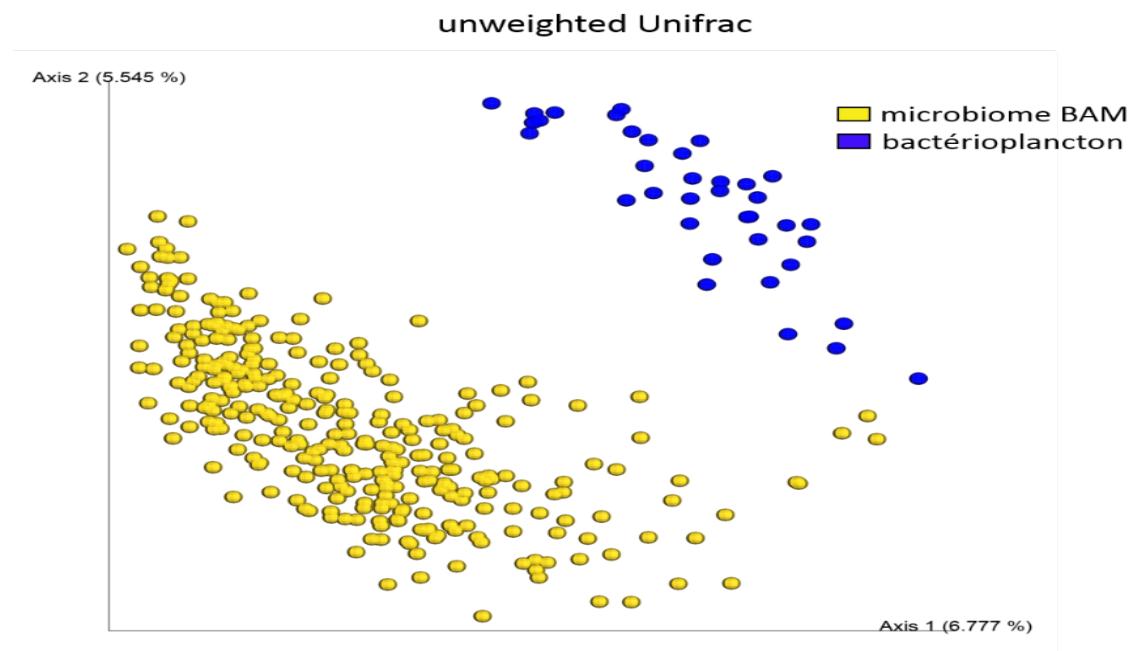


Figure 20. PCoA sur la matrice de dissimilarités unweighted unifrac des compositions bactériennes de l'eau et du barbeau. Les deux premiers PCoA1 et PCoA2, sont représentés et correspondent à 6,7 % et 5,5% de la variation totale. Chaque point représente un échantillon de peau (jaune) ou de la colonne d'eau (bleu).

Nous explorons ensuite les facteurs de variation de la diversité du microbiome cutané entre et au sein des bassins géographiques. L'analyse de variance (Anova) indique un effet significatif de ces deux niveaux de structuration géographiques sur la diversité Shannon (Anova, bassin $F=5.82$, $p<0.01$, site $F=8.7$, $p<0.01$) et DP (Anova, bassin $F=11.9$, $p<0.01$, site $F=11.2$, $p<0.01$). Nous observons notamment une très forte variabilité de la diversité bactérienne du microbiome cutanée entre les populations BAM d'un même bassin (Kruskall test, $p<0.05$, Figure 21).

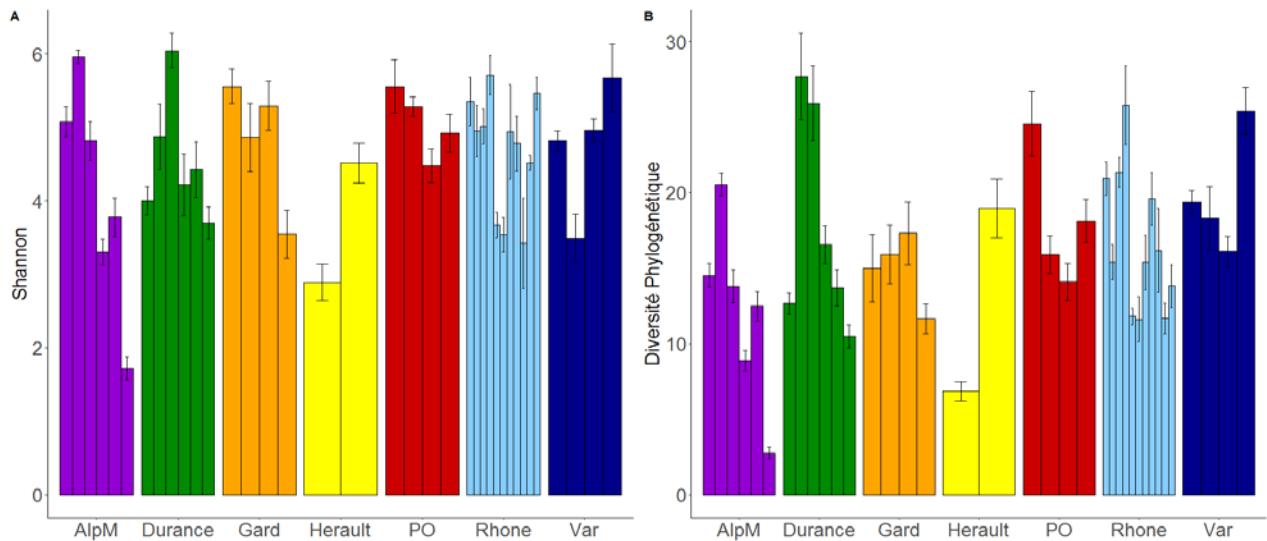


Figure 21. Diversité alpha, Shannon et Diversité Phylogénétique, du microbiome de la peau chez BAM dans chacune des populations et regroupés par bassins. Chaque barre correspond à la moyenne par site (+/- écart type) et chaque couleur correspond au bassin.

Nous avons analysé la structure géographique de la composition du microbiome des populations du barbeau méridional par une PCoA sur les matrices de dissimilarités Bray-Curtis, Jaccard et unweighted Unifrac. Quel que soit l'indice, les deux premiers axes PCoA1 et PCoA2 ne représentent qu'une part faible (<15%) de la variation totale. Graphiquement, nous ne visualisons pas nettement de structuration à cette large échelle spatiale. Cependant pour l'indice Bray-Curtis, basé sur des différences de proportion de variants bactériens, nous remarquons que PCoA1 discrimine les bassins de la Durance et des Alpes maritimes par rapport aux autres populations.

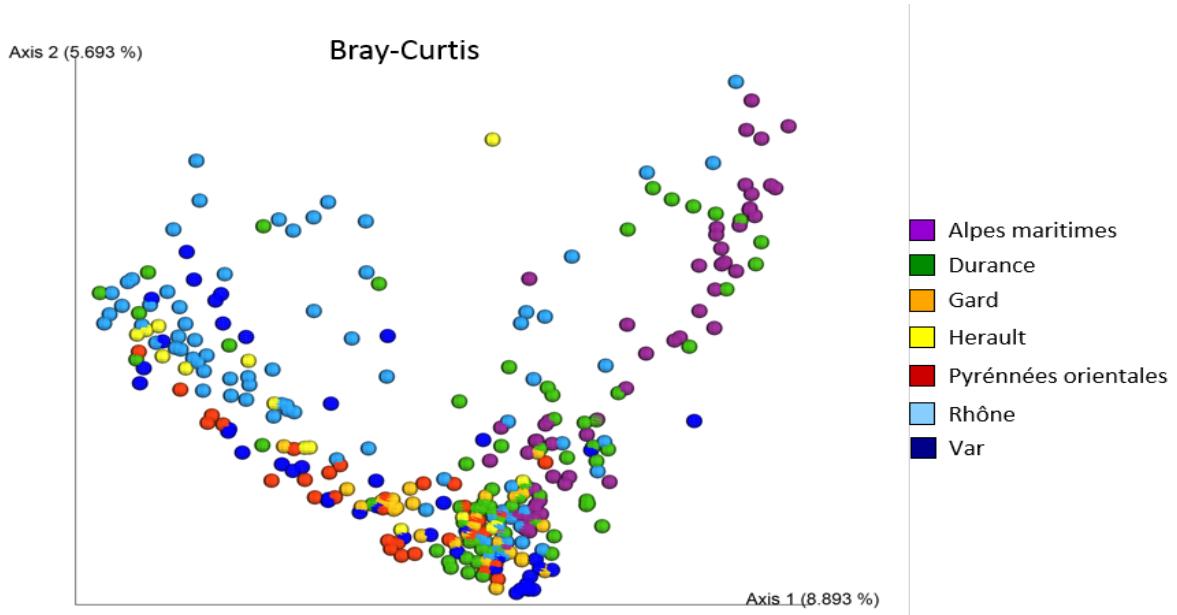


Figure 22. PCoA sur la matrice de dissimilarités Bray-Curtis des compositions bactériennes. Les deux premiers PCoA1 et PCoA2, sont représentés et correspondent à 8,9 % et 5,7% de la variation totale. Chaque point représente un individu dont la couleur correspond au bassin de regroupement.

La décomposition de la variance de composition du microbiome indique un effet significatif du bassin de regroupement, mais surtout une variabilité à une échelle locale, i.e. entre les populations (Permanova, Bray-curtis : Bassin, pseudo-F=9.44, R²=0.10, p<0.01, sites, pseudo-F=4.87, R²=0.38, p<0.01).

L’analyse taxonomique confirme une variabilité forte entre populations, c’est à dire à une échelle géographique locale (Figure 21). Cette variabilité est observée à l’échelle même des phylums comprenant majoritairement *Proteobacteria*, *Bactroïdetes*, *Actinobacteria*, *Deinococcus-Thermus* et *Fusobacteria*. Nous remarquons que l’abondance de *Fusobacteria* est un facteur de discrimination des populations des Alpes maritimes et de plusieurs populations de la Durance. Cette variation taxonomique explique le patron observé à l’échelle des bassins pour l’indice Bray-Curtis (Figure 22).

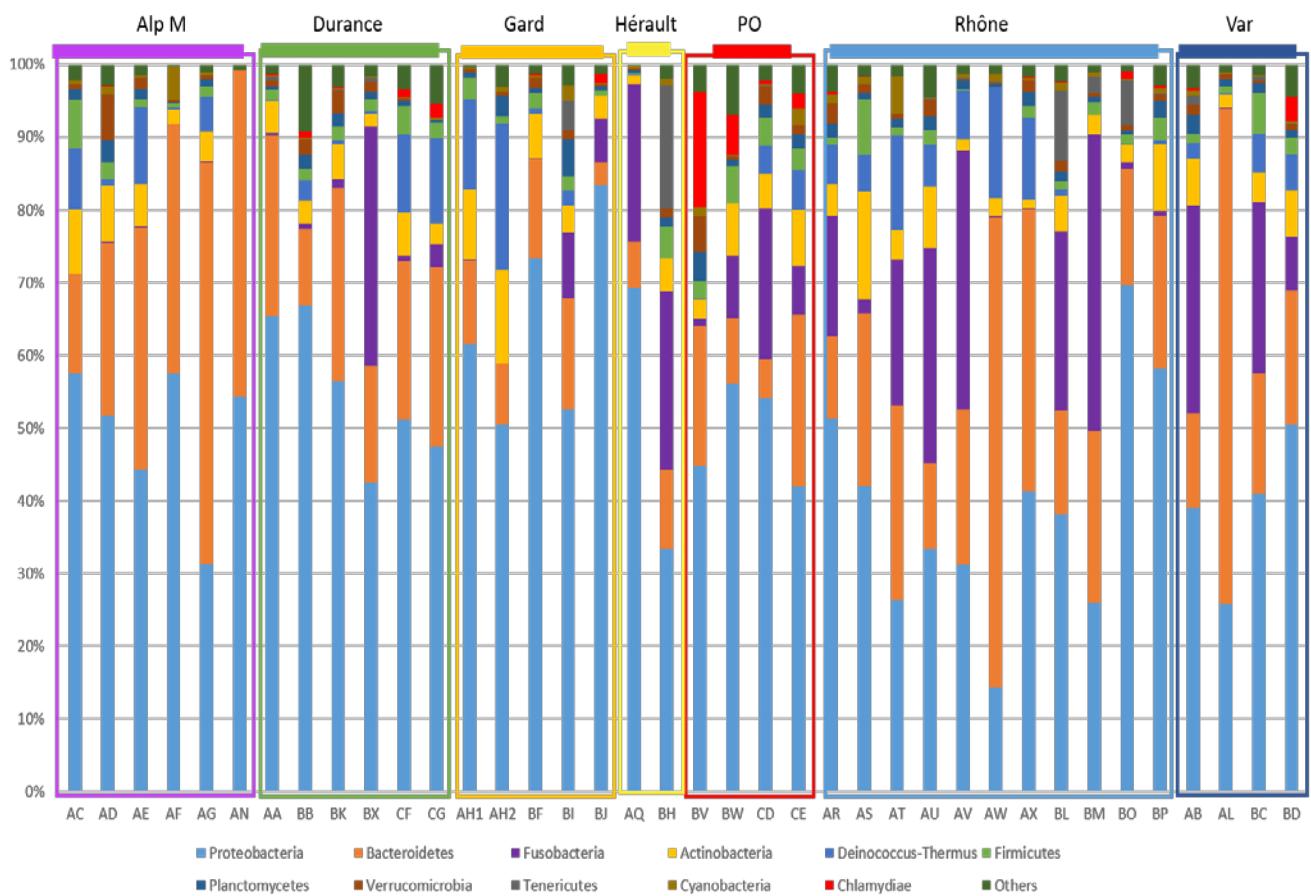


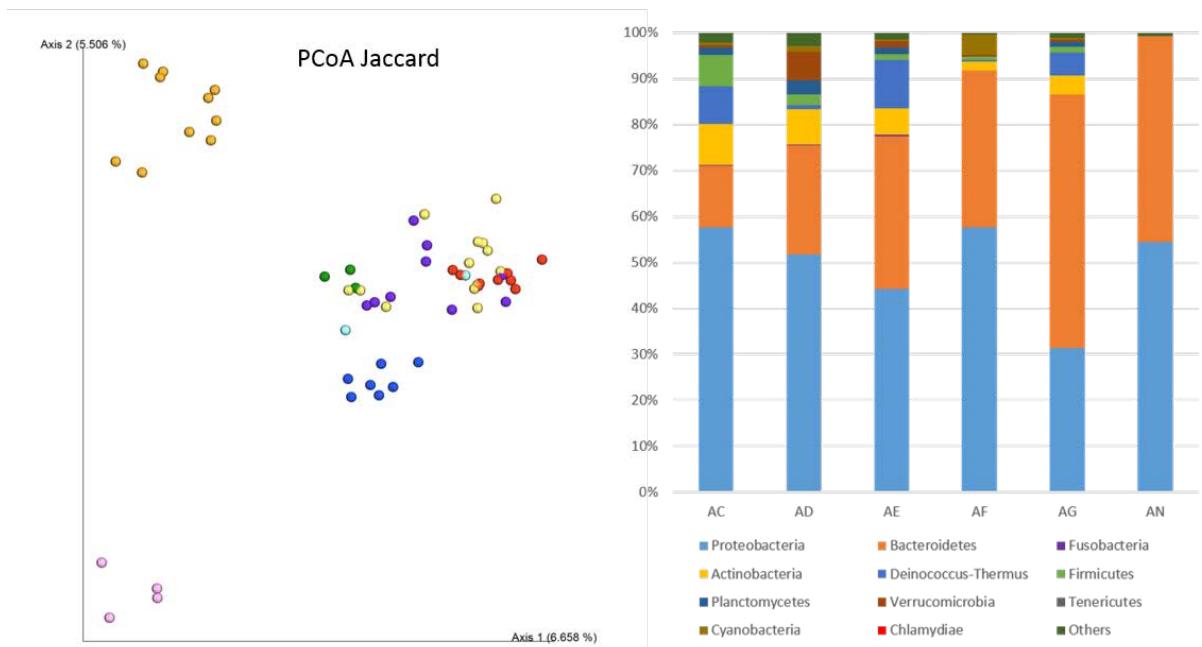
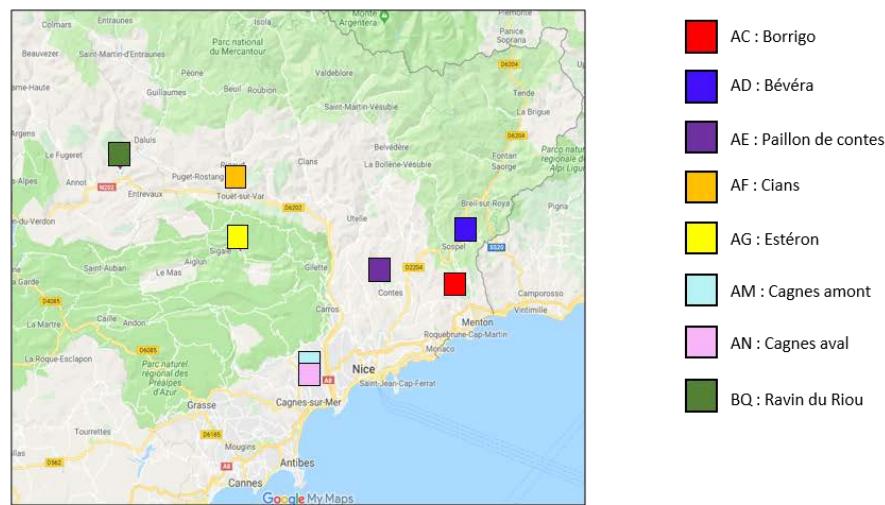
Figure 23. Abondance relative des phylums bactérien dans les populations de *B. méridionale*. L’abondance relative correspond à la valeur moyenne par population. Les 10 phylums les plus abondants dans l’ensemble du jeu de données sont représentés, les autres phylums sont regroupés sous le terme « Others ».

A une échelle spatiale réduite, *i.e*, au sein des bassins géographiques, nous dissocions plus clairement les populations BAM dont le microbiome cutanée présentent une composition bactérienne spécifique.

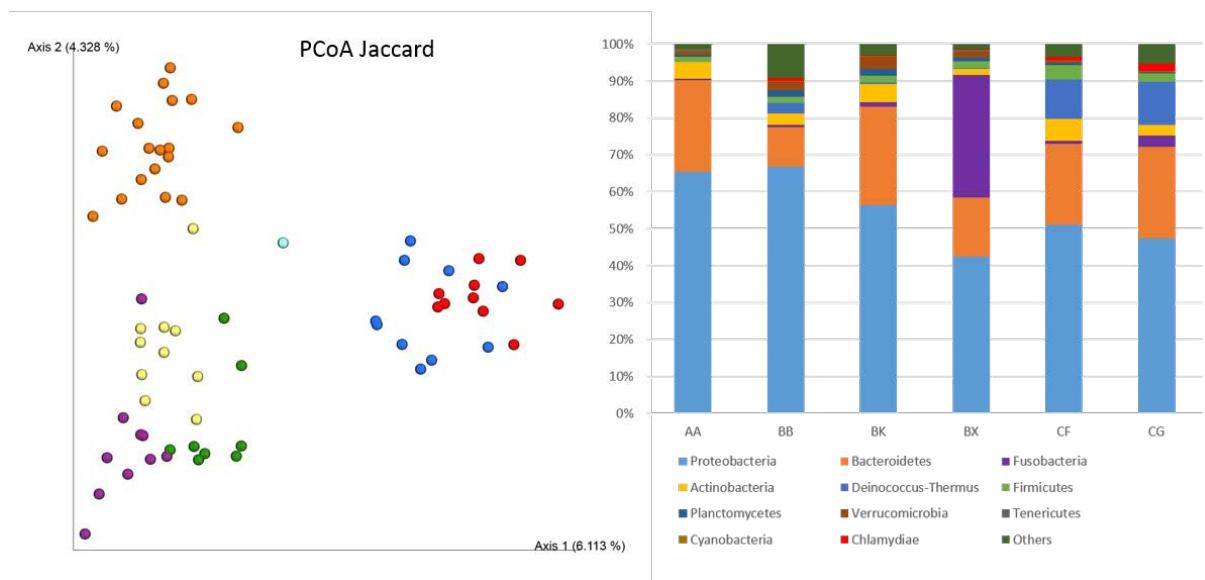
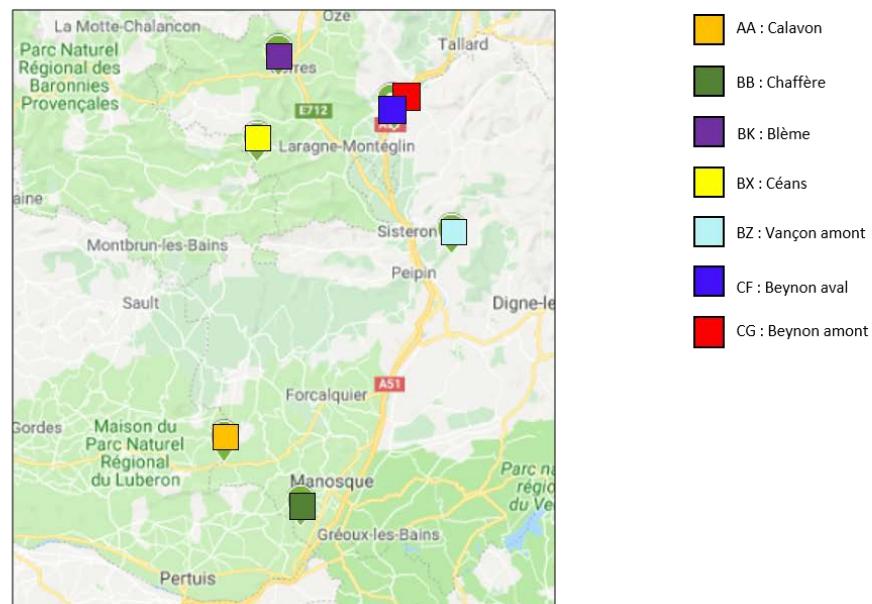
Nous présentons ci-dessous les résultats par Bassin comprenant :

- la représentation des 2 premiers axes de la PCoA pour l'indice Jaccard. Chaque point correspond à un individu dont la couleur correspond au site d'échantillonnage. La distance entre 2 points est d'autant plus grande que la composition (présence/absence de variant) du microbiome est différente.
- la composition taxonomique moyenne de chaque population pour lequel nous avons obtenu un minimum de 4 valeurs, (fig.24, Alpes Maritimes ; fig.25, Durance ; fig.26, Gard ; fig.27, Hérault ; fig.28, Pyrénées orientales ; fig.29, Rhône ; fig.30, Var).

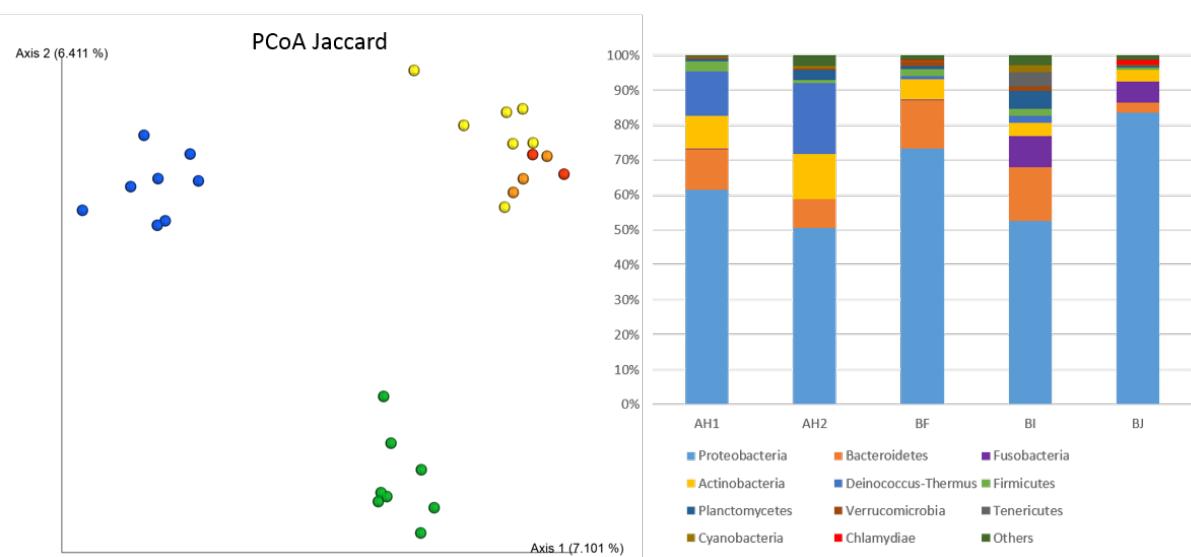
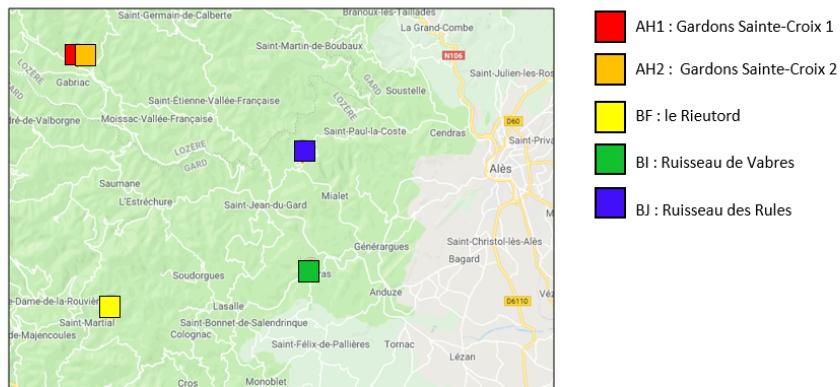
Alpes maritimes



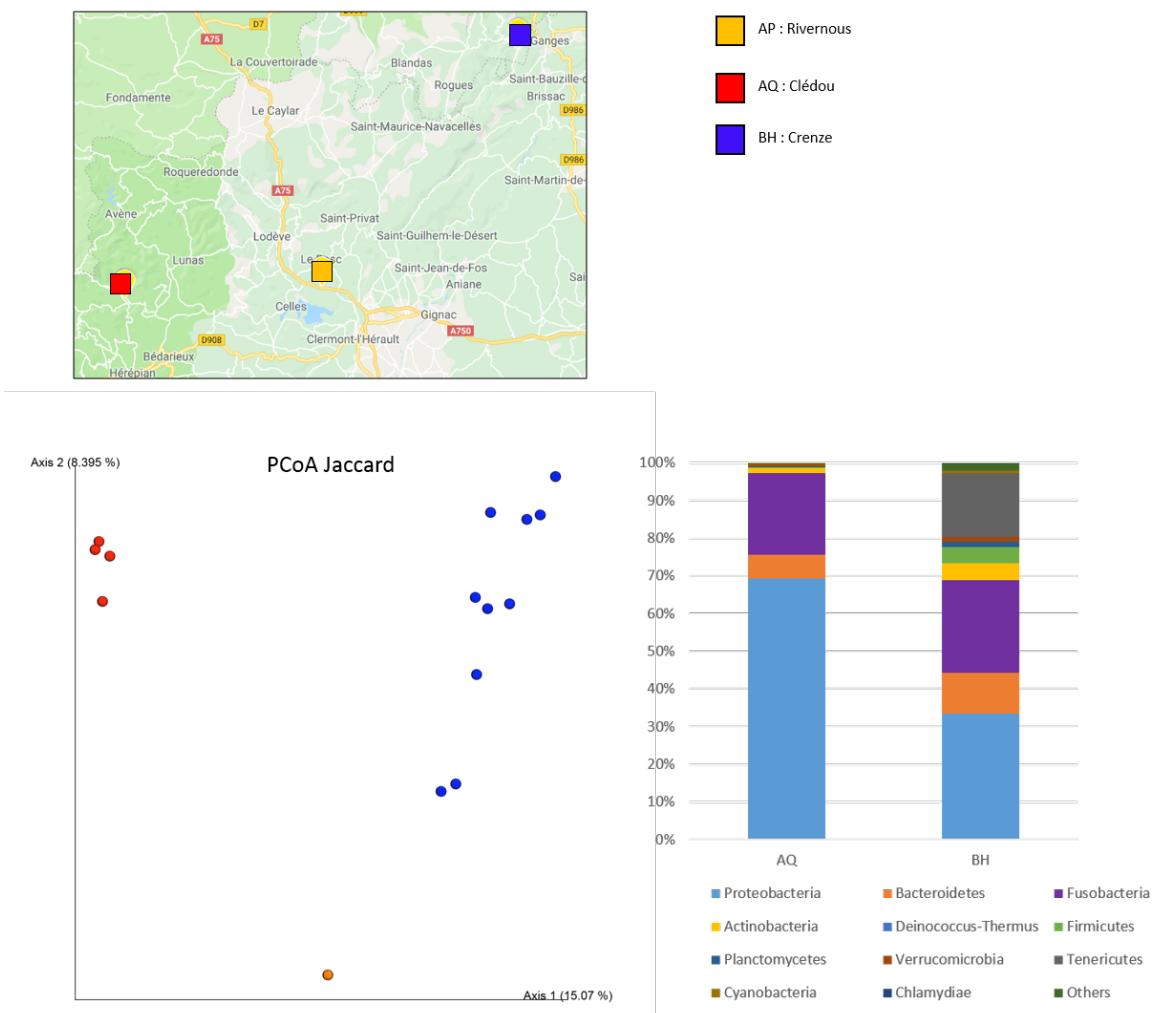
Durance



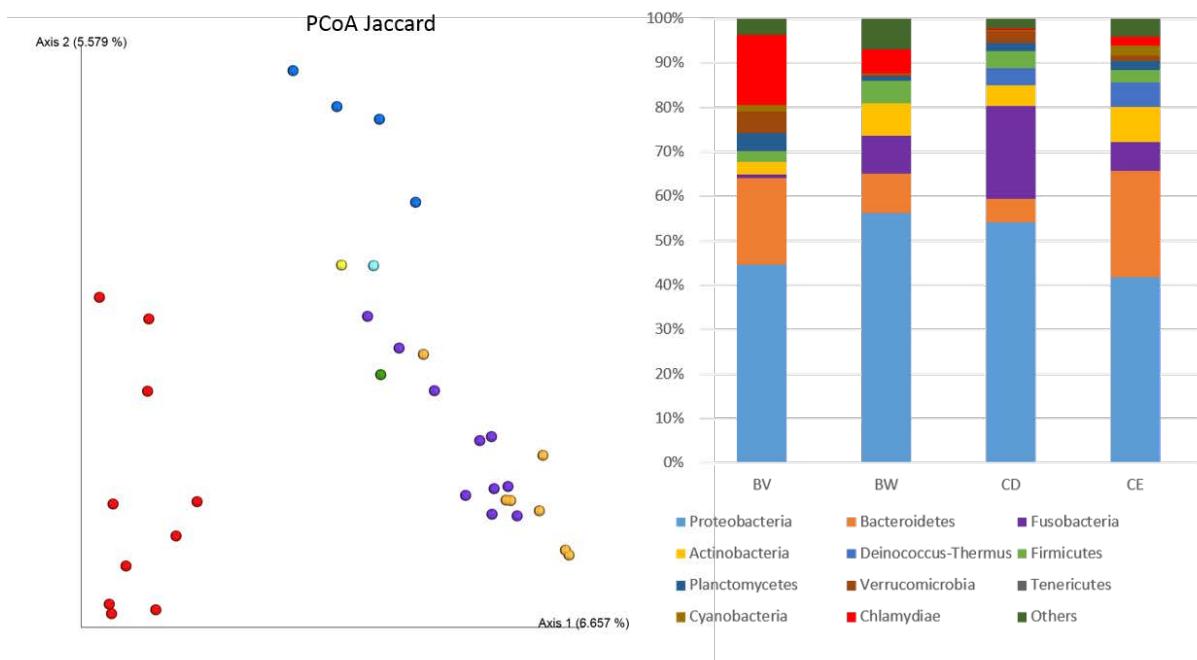
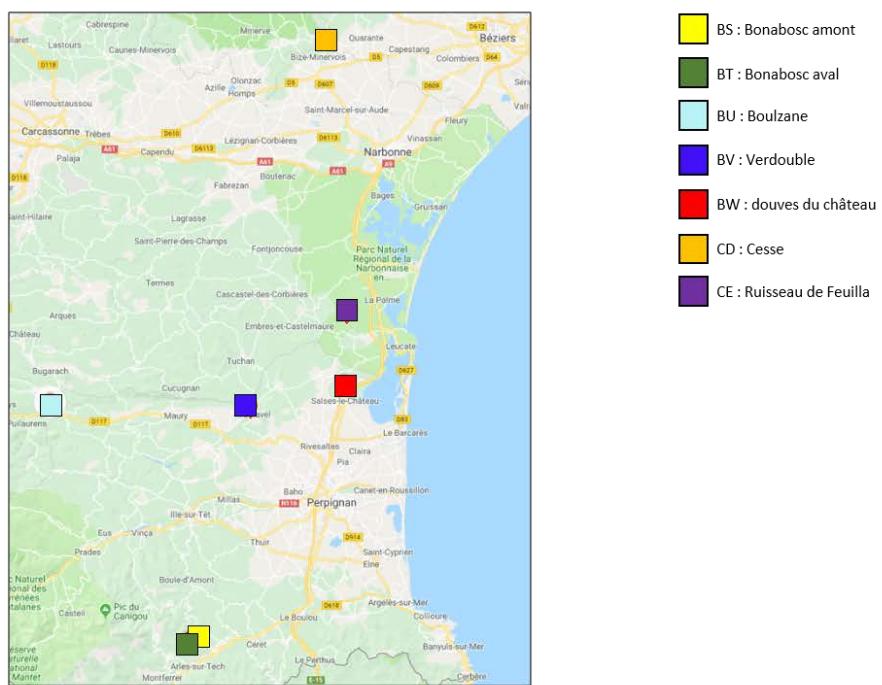
Gard



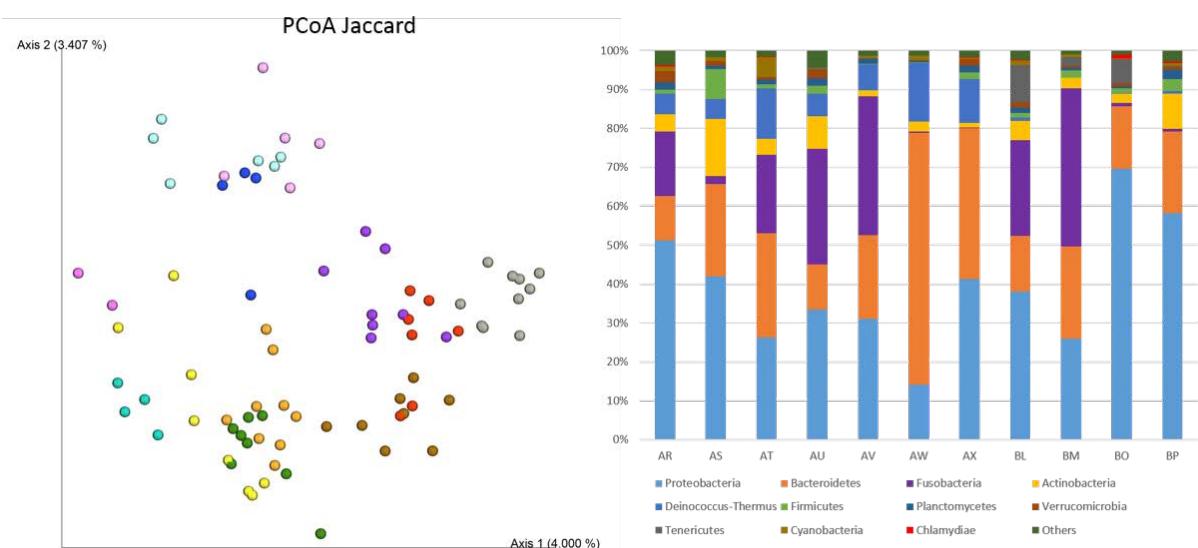
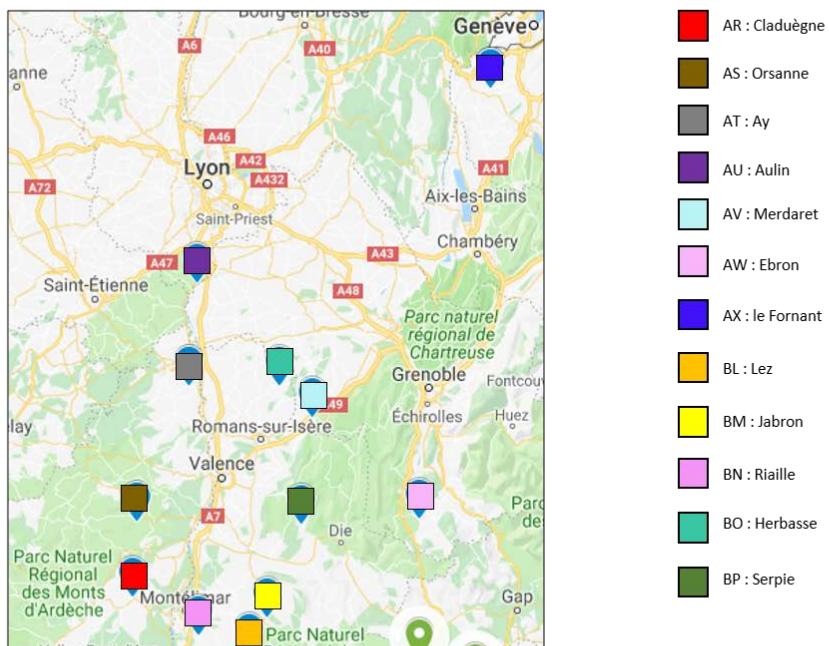
Hérault



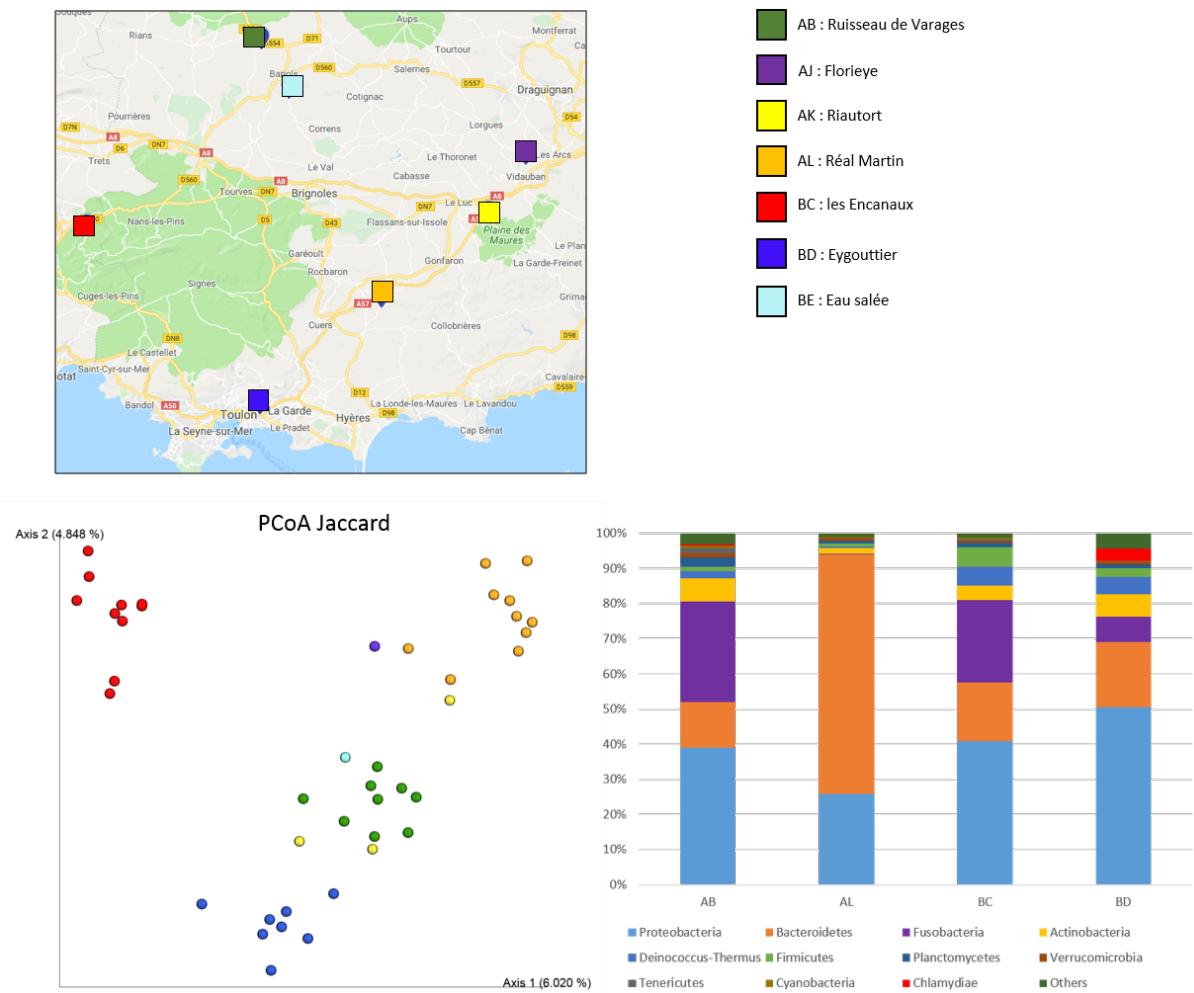
Pyrénées Orientales



Rhône



Var



6.4.5. Détection de bactéries pathogènes

L'analyse du microbiome par les outils moléculaires offre la possibilité de rechercher la présence de bactéries spécifiques et notamment des bactéries pathogènes. Cette démarche éclaire sur le potentiel de cet outil pour de futures études épidémiologiques et plus généralement le suivi de santé d'espèces protégées tel que le Barbeau méridional.

Nous nous sommes intéressés à trois bactéries pathogènes connues chez les poissons d'eau douce, notamment en aquaculture, mais encore non décrite chez *B. meridionalis* : *Candidatus Piscichlymidia* sp. (CP), *Candidatus Branchiomonas cysticola* (CBc) et *Flavobacterium columnare* (Fc), (connues sont le nom de pourriture des nageoires). Ces bactéries sont responsables de lésions de l'épithélium au niveau des branchies ou de la peau (Declercq *et al.*, 2013; Wiik-Nielsen *et al.*, 2017). Ces lésions constituent des portes d'entrée pour d'autres infections et peuvent conduire à une mortalité importante.

Notre approche se veut conservatrice en présentant ici uniquement la présence de CP, Fc et CBc dans les sites échantillonnés. L'absence de détection ne signifie pas l'exemption de ces sites

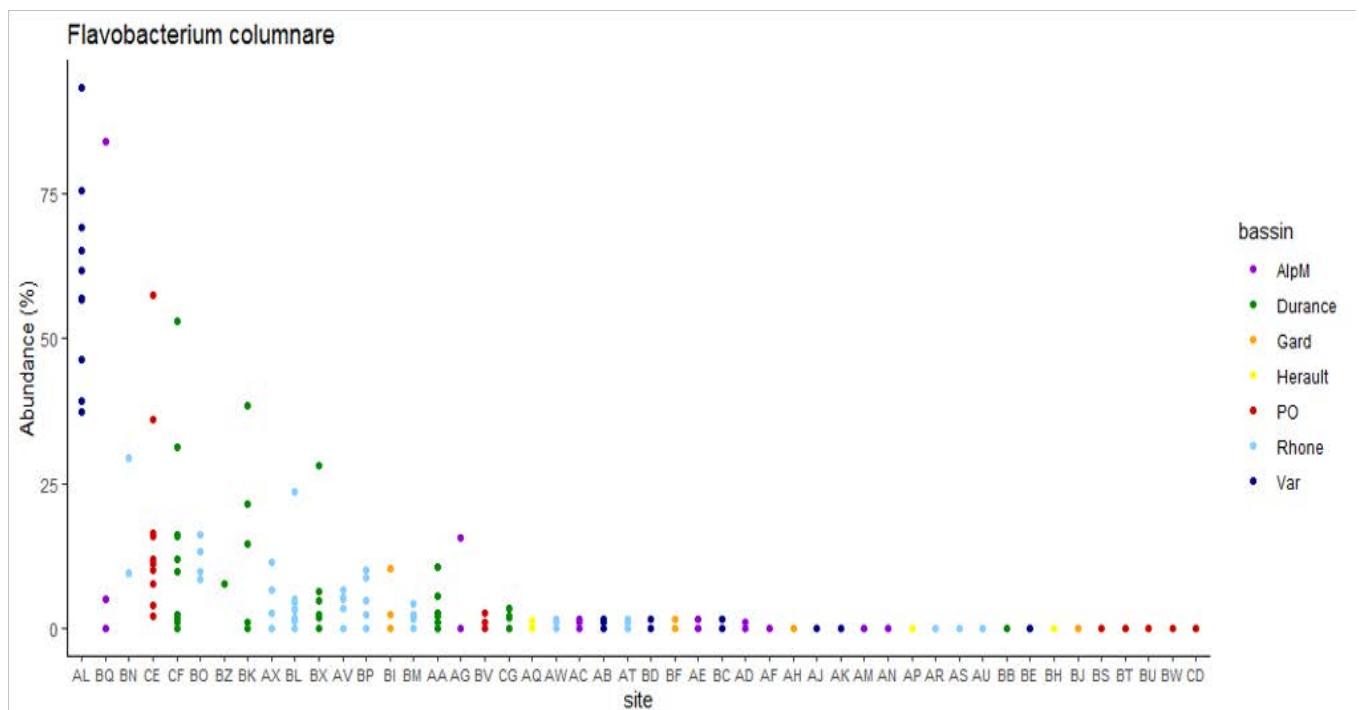
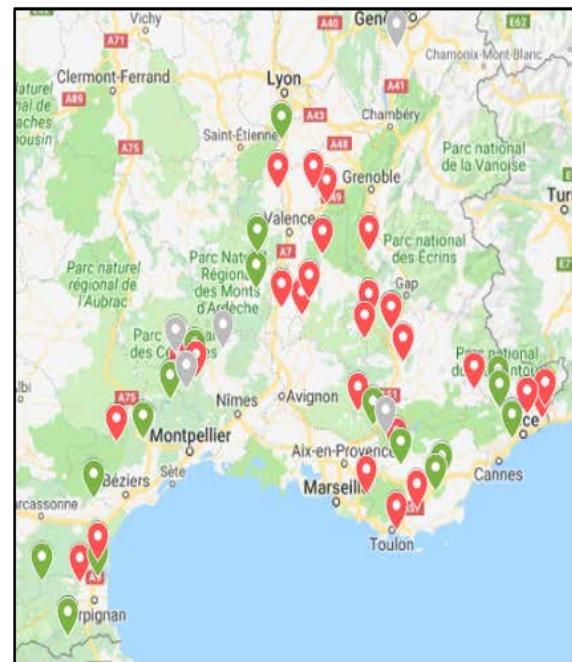
de tout risque infectieux. Nous considérons un seuil de détection correspondant à 1% du microbiome afin de réduire le biais potentiel lié à de faux positifs.

Les résultats indiquent une présence de Fc, CP et CBc dans respectivement 29, 16 et 22 sites (Figure 30). La répartition géographique de ces cas positifs est relativement large avec Fc et CBc détectés sur tous les bassins, et CP présent en Durance, Rhône, Var, Gard et surtout PO. L'abondance relative de ces bactéries pathogènes dans le microbiome peut atteindre des valeurs élevées : 93% pour Fc, 44% pour CP et 73% pour CBc, induisant des forts déséquilibres de la composition microbienne de ces communautés. Nous notons la présence de Fc dans 10/10 individus du site de Réal Martin (Var) avec une abondance relative de 37% à 93%. Ce résultat vient confirmer l'observation sur le terrain de lésions cutanées importantes sur les barbeaux de ce site (*cf photo fiche station*). Nous détectons CP dans 8/10 individus (2% à 11% du microbiome) sur le site des douves de la forteresse de Salses (PO) suggérant une forte prévalence dans ce site.

Nous montrons par cette démarche l'étendue de l'information écologique obtenue par l'approche moléculaire par l'étude du microbiome. Des données plus complètes sont maintenant nécessaires pour préciser la prévalence de ces pathogènes chez *B. meridionalis* mais également sur les espèces en sympatrie.

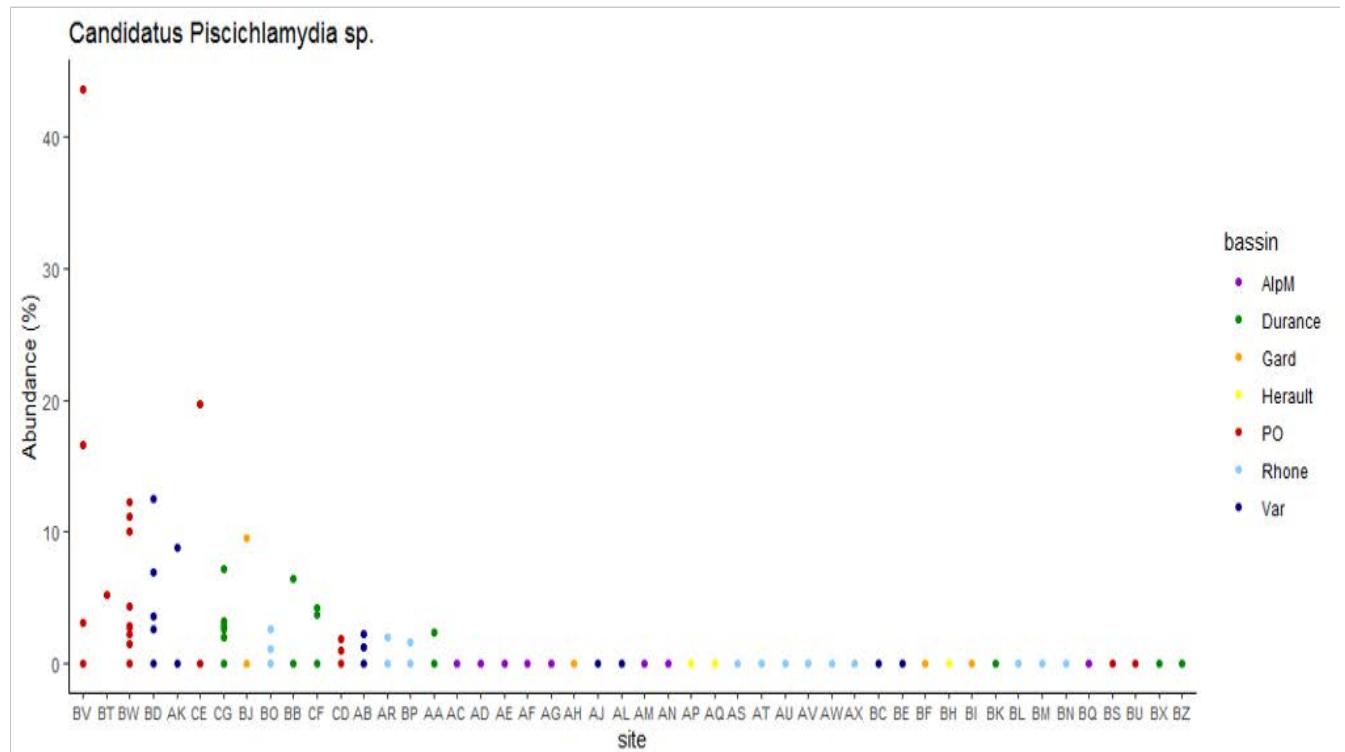
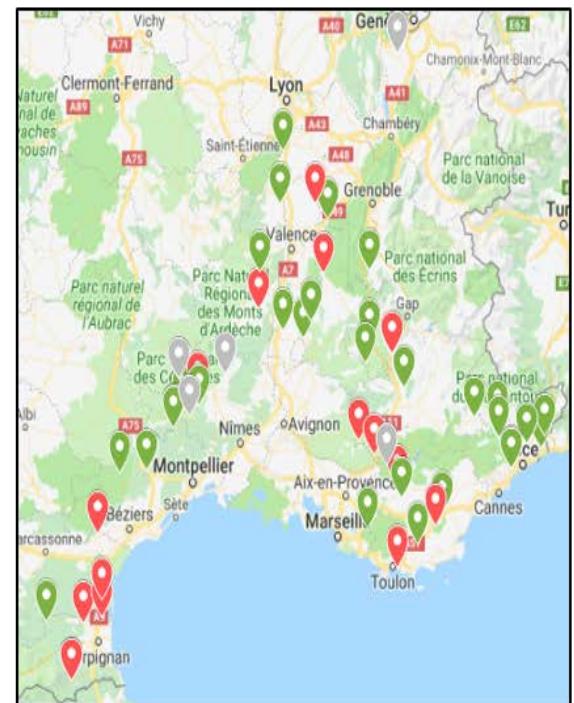
A) *Flavobacterium columnare*

- détectée
- non détectée
- donnée non disponible



B) *Candidatus Piscichlamydia* sp.

- détectée
- non détectée
- donnée non disponible



C) *Candidatus Branchiomonas cysticola*

- détectée
- non détectée
- donnée non disponible

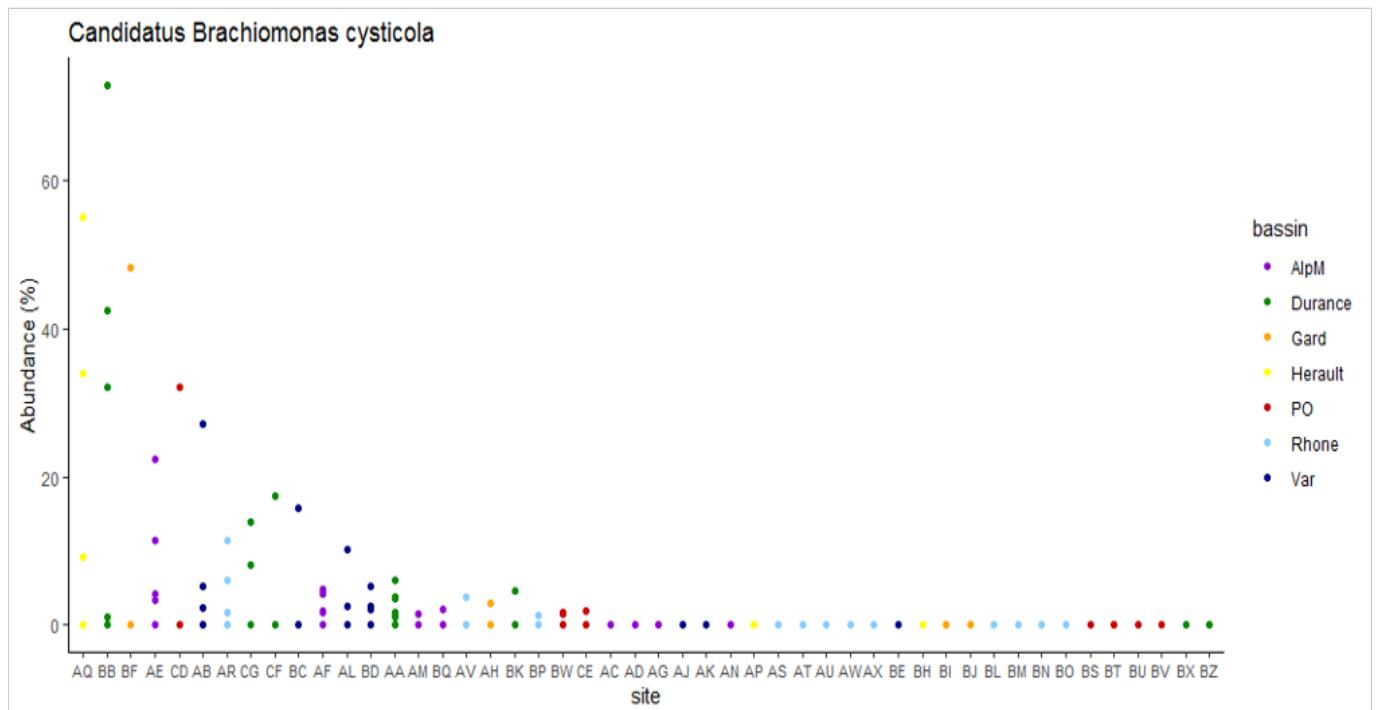
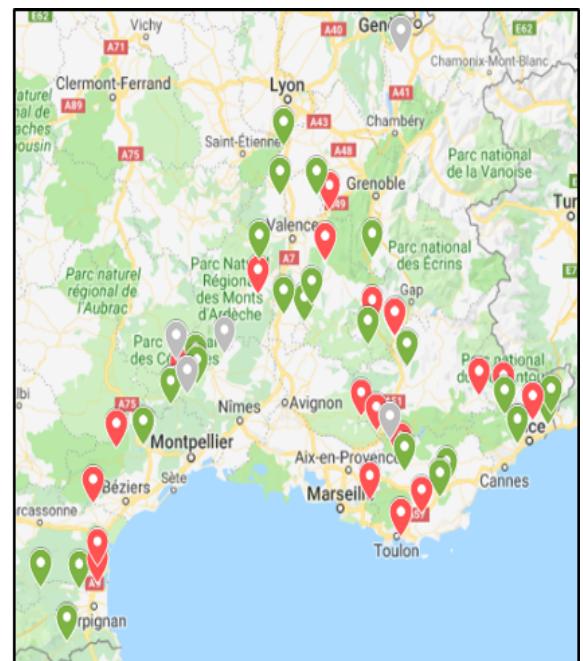


Figure 31. Détection des phylums bactérien A) *Flavobacterium columnare* B) *Candidatus Piscichlamydia* sp. et C) *Candidatus Branchiomonas cysticola*, dans le microbiome cutané de *B. meridionale*. La carte indique les sites pour lesquels le pathogène a été détecté. Le graphique indique l'abondance relative du pathogène par individu et par site dont la couleur correspond au bassin de regroupement.

6.4.6. Discussion sur l'étude du microbiome

La description physico-chimique des habitats des populations BAM indique une faible variabilité de température, oxygénation et concentrations en éléments azotés et phosphorés. Cette homogénéité apparaît clairement dans le tableau brut des paramètres d'eau (tableau VI) mais aussi dans les résultats des analyses multivariées (Figure 16 et 19). On observe en effet que les sites de présence du BAM ne sont que faiblement discriminés sur la physico-chimie des cours d'eau à l'exception de quelques sites atypiques (exemple : Eau salée). Ces résultats suggèrent que la qualité des cours d'eau de l'aire de répartition du BAM est relativement homogène, du moins pour ces paramètres dont la variabilité peut être journalière.

L'étude du bactérioplancton montre une diversité élevée des communautés bactériennes de la colonne d'eau, bien que celle-ci ait été réalisée sur un seul point par site. La diversité Shannon ou DP du bactérioplancton ainsi décrite présente une relative homogénéité entre bassins, même si une variabilité entre sites suggère des conditions environnementales locales des masses d'eau influençant le développement bactérien.

Le microbiome cutané des populations de BAM présente une forte variabilité de diversité, Shannon et DP, entre bassins et au sein même d'une région comme les Alpes maritimes entre la population de Cagnes aval (Shannon = 1,4) et de Bévéra (Shannon = 6,0). Comme pour le bactérioplancton, nous ne montrons pas de lien entre la description des habitats suivants les paramètres physico-chimiques et la diversité du microbiome.

Cependant l'environnement est un facteur majeur qui façonne la diversité et la composition du microbiome cutané, et en particulier chez les organismes aquatiques. En effet ces derniers évoluent dans le milieu aqueux favorable au développement et à la dispersion des bactéries. Les bactéries présentes dans la masse d'eau constituent le bactérioplancton ; ce bactérioplancton est donc une source majeure des bactéries qui vont coloniser les différentes muqueuses du poisson et en particulier la peau. Mais nos résultats mettent en lumière l'existence de processus sélectifs complexes à l'interface poisson/masse d'eau que constitue le microbiome cutané. La discongruence entre les compositions du bactérioplancton et du microbiome cutané a récemment été souligné dans une étude sur le Silure (*Silurus glanis*) dans le bassin du Rhône (Chiarello *et al.* 2019). Premièrement, les conditions physico-chimiques telles que pH et oxygénation à l'échelle du micro-habitat que constitue le mucus de la peau sont bien différentes de celles en eau libre dans la masse d'eau. Cet environnement de la peau va sélectionner les bactéries capables d'y adhérer et de s'y développer. Deuxièmement, la condition physiologique du barbeau dont le système immunitaire va opérer un tri, i.e. tolérer ou se défendre, face aux bactéries colonisant la muqueuse est également un élément de sélection. Enfin les multiples interactions spécifiques entre bactéries, certaines produisant les métabolites essentiels au développement des autres, vont également façonner la composition de cet écosystème particulier. Ainsi des taxons, comme *Pseudarcicella* ou hgcI clade connus et relativement abondants dans les cours d'eau en période d'été (Cruaud *et al.*, 2019), constituent une large proportion du bactérioplancton des cours d'eau Ay et Blèmes mais ne représentent qu'une faible proportion du microbiome des populations BAM qui y vivent.

6.5. La biocénose :

Les pêches de capture de *B. méridional* sur chacune des stations d'inventaire a permis de noter la présence de toutes les espèces capturées en présence-absence. De ce fait, nous pouvons décrire la fréquence d'occurrence des espèces d'accompagnement sur les 55 stations : les espèces d'accompagnement du *B. méridional* sont, par ordre d'importance décroissante (fréquence d'occurrence 0,5 à 0,6), le Vairon (*Phoxinus ssp*), le Blageon (*T. souffia*), le Chevaine (*S. cephalus*) et la Truite (*S. trutta*), qui constituent le premier groupe. Quelques espèces sont rencontrées plus rarement sur les stations avec le *B. méridional*, Anguille (*A. anguilla*), Loche franche (*B. barbatula*), Goujon (*Gobio spp*), elles forment le second groupe (fréquences d'occurrences de 0,15 à 0,25). Enfin des espèces sont peu fréquentes (fréquences < 0,1), il s'agit du Hotus (*C. nasus*), du Toxostome, (*P. toxostoma*) du Spirlin (*A. bipunctatus*), du Chabot (*C. gobio*) et du Gardon (*R. rutilus*).

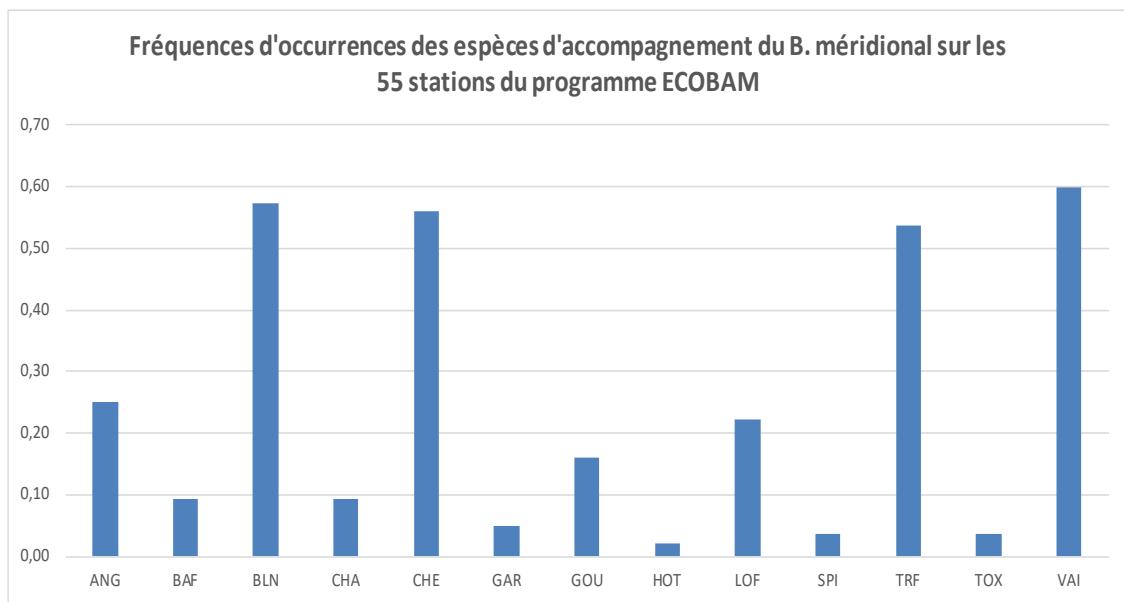


Fig. 32. Fréquences d'occurrences des espèces d'accompagnement du BAM sur les stations d'études ECOBAM.

Histogramme général des captures réalisées :

L'histogramme de la répartition par classes de tailles des 1256 barbeaux étudiés (1193 dans le cadre de l'étude et 63 individus supplémentaires) et des individus surnuméraires c'est-à-dire tous les individus trop petits pour être intégrés à l'étude génétique ($L_f < 60$ mm) permet de réaliser la Figure 32. Les individus capturés présentent des tailles comprises entre 40 mm et 340 mm, c'est-à-dire que nous avons capturés des individus présentant une taille supérieure à ce qui est généralement décrit dans la littérature spécialisée (Spillmann, 1961 ; Keith *et al.* 2011). Les individus de 40 à 60 mm sont uniquement identifiés visuellement.

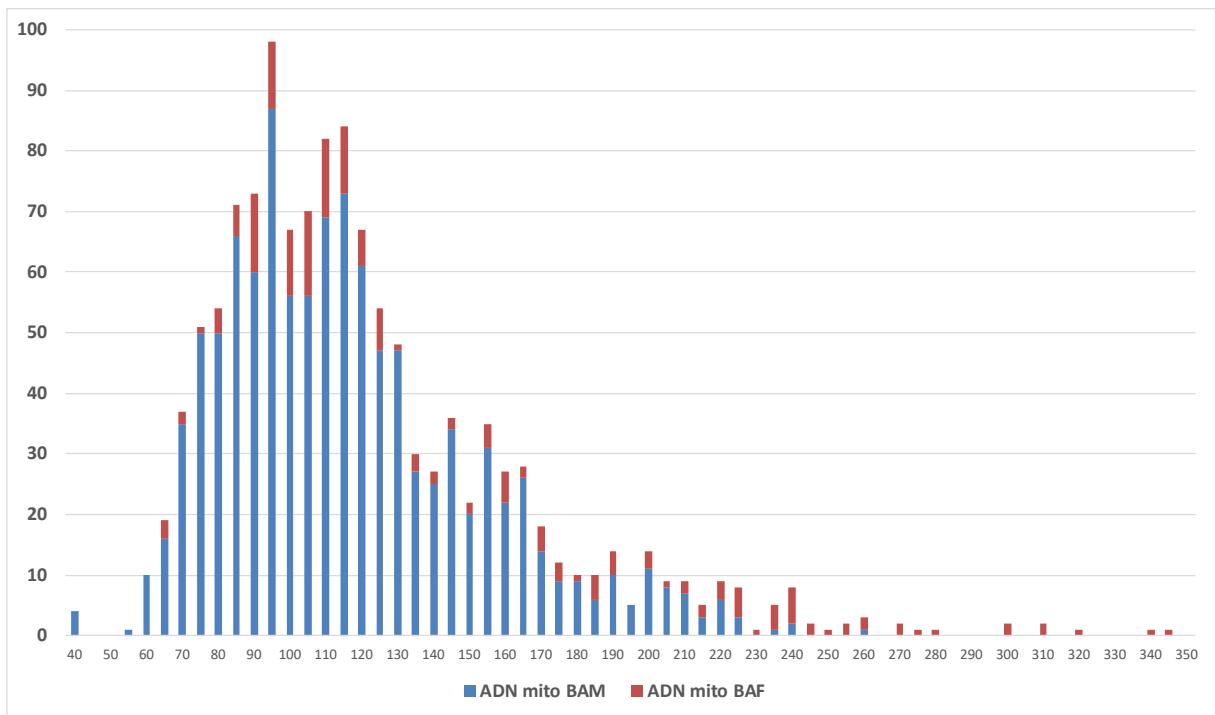


Fig.33. Répartition par classes de taille de 5mm des tous les barbeaux capturés dans le cadre de l'étude ECOBAM (Lfmm) en fonction de leur ADN mitochondrial. Sur le graphique manque cinq barbeaux d'une taille supérieure à 350mm à ADNmit BAF.

L'analyse génétique réalisée nous permet de réaliser un graphique plus précis de répartition par taille des barbeaux capturés car il est probable que des individus capturés soient des hybrides. Le graphique réalisé montre cependant que l'on peut avoir quelques barbeaux d'une taille supérieure à 200mm avec un ADN mitochondrial BAM. S'agit-il d'individus introgressés ? L'analyse de l'ADN nucléaire apportera des informations sur ce sujet. On note qu'au-delà de 270 mm les individus rencontrés dans l'étude présentent un ADNmit BAF.

Altitude : Au cours des prélèvements du programme ECOBAM, l'espèce est rencontrée dans des cours d'eau d'altitudes très variées, depuis 7 m NGF pour la station des douves de la forteresse de Salses (P. orientales) jusqu'à 750 m pour le Céans, affluent du Buech (Hte Alpes) ; le graphique illustre la répartition altitudinale des captures (bleu) et des stations préalablement définies comme stations à *B. meridionalis* mais qui n'ont pas permis, en été 2018, la capture en nombre suffisant de barbeau (en orange). La répartition altitudinale n'explique pas l'absence de captures dans certaines stations, cette absence résulte de la faible hydrologie de l'été 2017.

Répartition altitudinale des captures et non captures de *B. meridionalis*

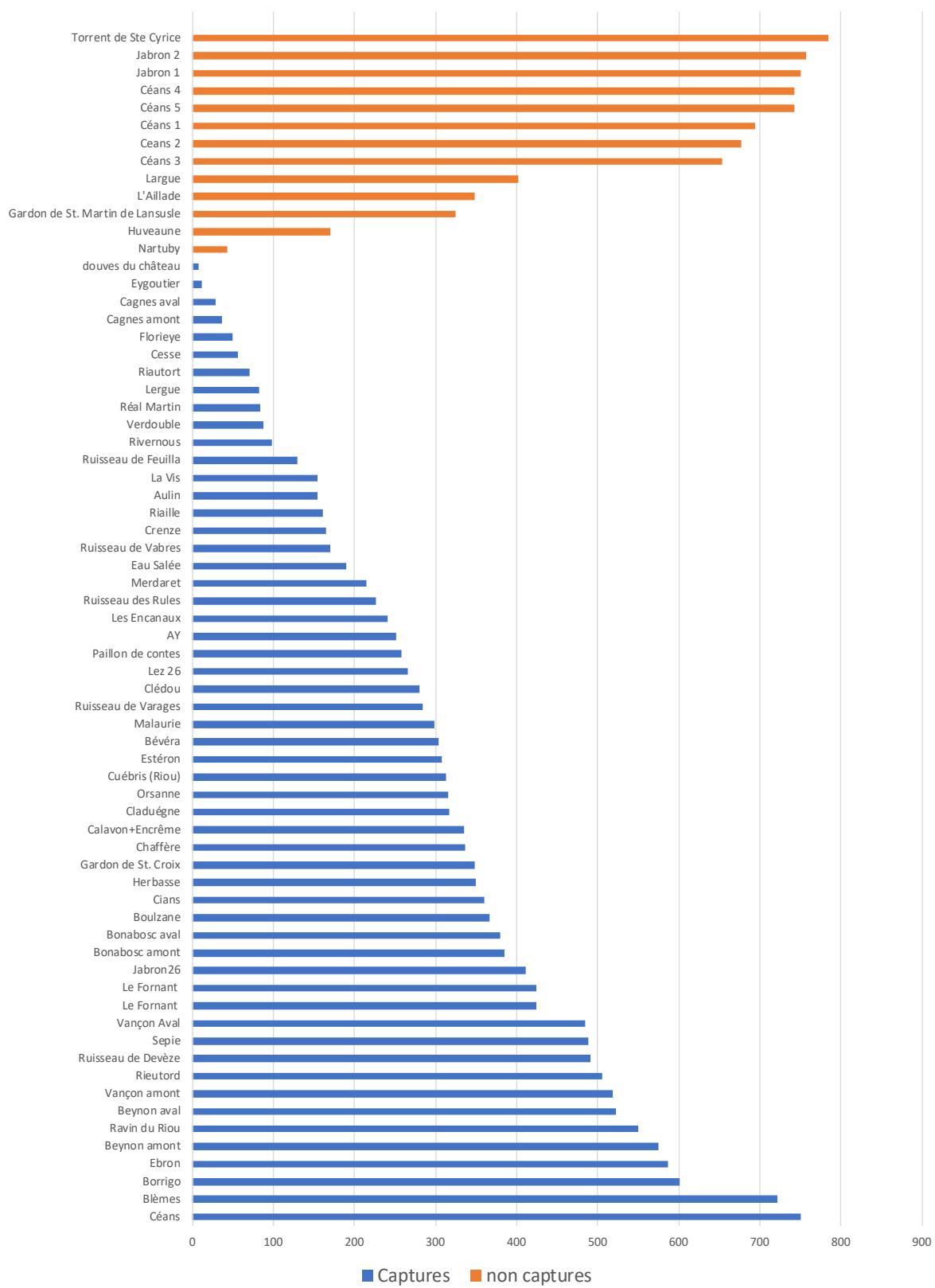


Figure 34. Répartition altitudinale des barbeaux capturés (en abscisse- altitude en mètres)

Dans la littérature, le BAF occupe une place plus amont dans les bassins versants du fait de la compétition avec le BAF lorsque les deux espèces sont en sympatrie. Il nous a paru intéressant d'étudier la répartition altitudinale des barbeaux capturés dans le cadre du programme ECOBAM en fonction de leur ADN mitochondrial (ADN_{mt} BAF ou ADN_{mt} BAM). La mitochondrie étant transmise à l'œuf par l'ovule, en étudiant l'ADN_{mt} nous pouvons connaître l'haplotype de la mère de chacun des barbeaux étudiés : on suit la lignée femelle.

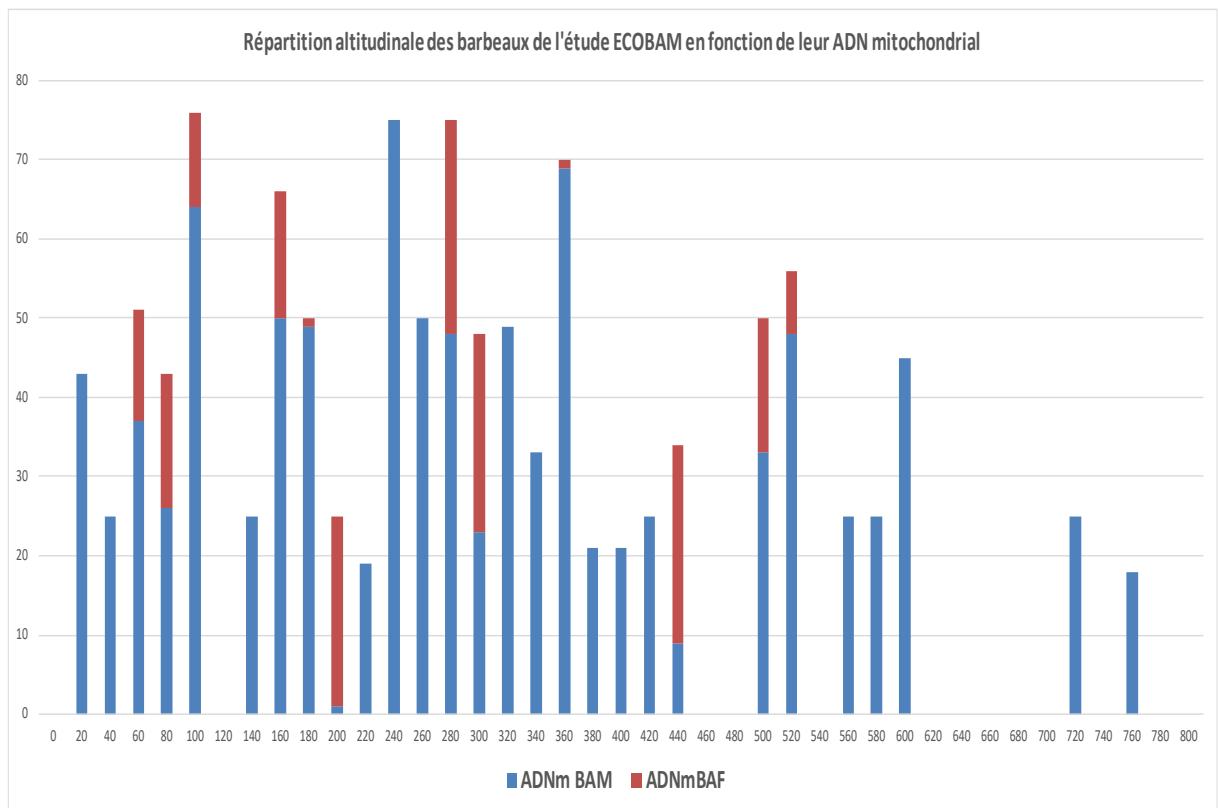


Fig. 35. Répartition altitudinale des barbeaux capturés en fonction de leur ADN mitochondrial (en abscisse - altitude, en ordonnée, nombre individus).

Les barbeaux à ADN_{mt} BAM sont bien évidemment plus nombreux, du fait qu'ils sont recherchés pour l'étude par identification visuelle (identification parfois imparfaite !). Ils sont présents sur une gamme altitudinale qui s'étend de 7 à 750m. Les barbeaux à ADN_{mt} BAF occupent une répartition plus réduite de 60 à 520m.

Il sera bien évidemment intéressant d'observer cette répartition avec les résultats de l'ADN nucléaire.

La conductivité, sur les stations de prélèvements, présente des variations également très importantes $4170 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-2}$ sur l'Eau Salée dans le Var (absente du graphique) et inférieure à $50 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-2}$ sur le Ravin de Dévèze en Lozère. L'espèce semble capable ainsi de s'adapter à des conductivités très variables ; à ce titre une étude de biologie de l'espèce serait intéressante à réaliser.

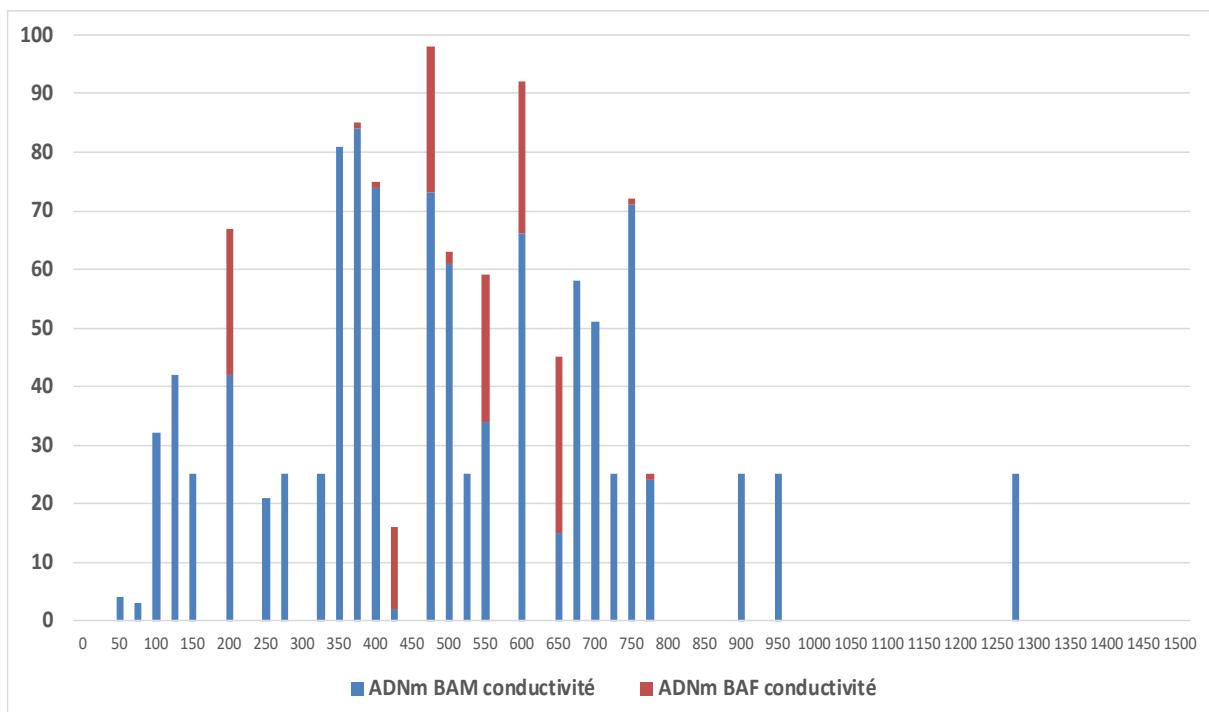


Fig.36. Répartition des captures de BAM en fonction de la conductivité (en abscisse), nombre d'individus (en ordonnée) par catégorie d'ADN mitochondrial. (Hors stations, Salses et Eaux Salées)

Le barbeau à ADN_{mit} BAM se rencontre sur un ensemble de valeurs de conductivités très élevées quasi comparables aux valeurs où le BAF est rencontré. La population des douves de la forteresse de Salses est composée de barbeaux à ADN_{mit} BAM, la population de l'Eau salée est constituée essentiellement d'individus à ADN_{mit} BAF (1 haplotype BAM).

Dans toutes les stations, l'**oxygène** dissous est proche ou supérieur à 8mg/l sauf sur le ruisseau des Feuilla (4,8 mg/l et 54,1% de saturation), mais s'agissant d'une résurgence souterraine, c'est assez classique.

Le **pH** est proche de 8 sur la plupart des stations de captures, parfois plus faible (inf à 7,5) sur les stations des Alpes Maritimes ou de l'Aude, parfois supérieur à 8,5 (Florieye et Blèmes).

L'espèce est présente dans des milieux de **températures** variées, en période estivale, la température au moment de nos pêches en période estivale était comprise entre 15,4 °C Ravin du Riou (pêche à 10:00, le 20/08/2018) et 27,1 °C sur la Claduègne (pêche à 14:00, le 10/07/2018). Une de nos stations de pêche a été réalisée plus tôt en saison (15/05/2018), sur le Calavon et son affluent l'Encreme, pour profiter d'une pêche RHP avec le Service Départemental de l'AFB 84, la température était alors de 11,9 °C.

Plusieurs fédérations ont mis en place d'importants réseaux thermiques, c'est le cas de la Fédération du Gard qui rédige un rapport annuel très élaboré. Plusieurs fédérations disposent d'un réseau thermique important (06, 13 notamment). Cependant, si de nombreuses stations thermiques correspondent aux cours d'eau où nous avons échantilloné, les altitudes des stations thermiques de suivis et des stations ECOBAM sont différentes de plusieurs centaines de mètres et nous ne pouvons pas toujours utiliser l'important travail réalisé.

7. Conclusion partielle

Que voilà un exercice difficile alors que l'étude est en cours. Les prélèvements ont été réalisés avec plus ou moins de réussite mais dans le cadre d'une dynamique forte, tous, Fédérations de Pêche, Agence Française de la Biodiversité et scientifiques étaient très impliqués dans la réussite de l'étude. L'analyse en laboratoire est plus longue, beaucoup de choses sont encore à réaliser, notamment l'analyse des résultats sur l'ADN nucléaire. A ce sujet l'ADN de 400 individus a été amplifié et séquencé, il reste encore à amplifier et analyser l'ensemble des individus capturés.

De cette première partie nous retiendrons que :

Le barbeau méridional est représenté sur une échelle altitudinale importante de 7 à 750m ; il est vrai comme l'indique P. Berrebi que sa présence à faibles altitudes est liée aussi à l'absence du BAF (Pyrénées orientales, Var notamment). Il est présent sur des conductivités très variées de quelques $\mu\text{S.cm}^{-2}$ jusqu'à des valeurs supérieures à $4000 \mu\text{S.cm}^{-2}$, le BAF sur l'Eau Salée (Var) et le BAM sur la station Sales (P. orientales). L'espèce est capturée dans des milieux où la température mesurée est supérieure à 27°C .

Sur nos 55 stations de capture, les espèces d'accompagnement sont principalement et par ordre décroissant, le Vairon (*Phoxinus ssp*), le Blageon (*S. Telestes souffia*), le Chevaine (*S. cephalus*) et la Truite (*S. trutta*). Des barbeaux avec un ADN mitochondrial de *B. meridionalis* peuvent mesurer plus de 200 mm à la fourche.

D'un point de vue génétique nous avons développé, hors programme initial, une analyse de l'ADN mitochondrial (*cyt b*) de l'ensemble des individus capturés (1256 ind.). Une première approche sur l'ADN mitochondrial chez le BAM avec une trentaine d'individus (Aulin, Conan, Fornant, Bevera et Douctouyre du bassin de la Garonne) avait confirmé, les résultats des études sur les allozymes, c'est à dire la monomorphie des populations : une très faible variabilité génétique des populations de BAM (Berrebi *et al.* 1988 ; Persat et Berrebi, 1990 ; Jeandarme *et al.* 1992 ; Crespin et Berrebi, 1994 ; Berrebi et Tsigenopoulos, 2003 ; Markova 2010). L'ADN mitochondrial reste cependant un bon marqueur génétique des populations de Cyprinidés car il présente un taux d'évolution (c'est à dire une capacité à produire des nouveaux allèles par la mutation) modéré, Il permet à la fois la reconstruction de l'histoire évolutive d'une espèce (c'est-à-dire sa phylogéographie) et une estimation de sa diversité. L'ADNmt n'est transmis que par les femelles, il n'y aura qu'une seule copie d'ADNmt qui peut être transmise à la génération suivante. Ainsi, en ce qui concerne sa diversité, l'ADNmt est donc beaucoup plus sensible au goulot d'étranglement et à la dérive génétique que l'ADN nucléaire (Davis *et al.* 1999 ; Lawler *et al.* 1995 ; Nyström *et al.* 2006).

Sur la base des données mitochondrielles, nous pouvons émettre l'hypothèse que les populations de *B. meridionalis* sont issues d'une recolonisation récente des différents réseaux hydrogéographiques à partir d'une population source (après le dernier maximum glaciaire). En effet, ces populations présentent une très faible divergence génétique (maximum 0,2% de divergence).

De plus, cette recolonisation s'est faite par une expansion de la population (une croissance populationnelle), comme l'indique le réseau d'haplotypes (Figure 4) et l'analyse en mismatch (Figure 10).

L'isolement des réseaux hydro-géographiques a permis à une population, qui était en expansion, de générer de la diversité génétique (de nouveaux haplotypes). Cette population polymorphe a été séparée en plusieurs populations suite à l'isolement des rivières. Cet isolement des populations de *B. meridionalis*, couplée à des diminutions d'effectif, a facilité la fixation d'haplotypes nouveaux. On constate que de nombreuses populations de *B. meridionalis* sont isolées génétiquement et ne communiquent quasiment plus les unes avec les autres même lorsqu'elles appartiennent au même réseau hydro-géographique.

Sur les 55 populations étudiées 31 étaient monomorphes, c'est à dire qu'elles ne présentaient pas de diversité génétique, dont 27 présentaient l'haplotype ancestral H_1. La ressemblance génétique entre ces populations de *B. meridionalis* qui partagent exclusivement l'haplotype H_1 peut traduire soit :

- un lien de parenté historique (la dernière glaciation) couplé à des diminutions importantes des effectifs (pour des populations appartenant à des bassins différents ou à une même rivière).
- un brassage génétique actuel très important qui tend à homogénéiser ces populations (pour des populations appartenant à une même rivière). Cette hypothèse est très peu vraisemblable et surtout incontrôlable dans la mesure où il n'y a pas de polymorphisme.

Il sera important de vérifier avec les marqueurs nucléaires si la monomorphie de ces populations est due à un goulot d'étranglement très récent (effondrement des effectifs suite à une pollution mais peu probable car il faudrait qu'il affecte toutes les populations), un réchauffement atypique etc... ou un effondrement ancestral (impact de la dernière glaciation sur les effectifs de *B. meridionalis*).

En attendant les résultats de l'étude, en cours, sur les marqueurs nucléaires, il serait judicieux de réfléchir à un statut de conservation particulier pour certaines populations polymorphes et/ou présentant des haplotypes particuliers dont nous faisons la liste ci-dessous :

En considérant la richesse haplotypique et les haplotypes privés nous avons 10 populations :

- **AG2** (Cuébris-Riou, dépt. 06), pour le groupe Alpes maritimes,
- **AJ** (Florieu, dépt. 83) et **BC** (Les Encanaux, dépt. 13), pour le groupe Var,
- **BK** (Blèmes, dépt. 05), pour le groupe Durance,
- **AR** (Claduègne, dépt. 07) et **BL** (Lez, dépt. 26), pour le groupe Rhône,
- **CI** (Vidourle à Cros, dépt. 30) pour le groupe Gard,
- **BI** (Ruisseau de Vabre, dépt. 30) pour le groupe l'Hérault,
- **BU** (Boulzane, dépt. 66) et **BW** (Salses-le-château, dépt. 66) pour le groupe Pyrénées orientales auxquelles on ajouterait les populations :
- **AB** (Ruisseau de Varages, dépt. 83) du groupe Var, qui ont une diversité haplotypique importante

- **BY/BZ** (Vançon, dépt. 04) du groupe Durance qui ont un haplotype fixé exclusif.

Toutes ces populations sont très différentes les unes des autres. En regardant la Figure 5 on se rend compte **qu'en protégeant ces 13 populations nous conservons la quasi-totalité de la diversité génétique mitochondriale du *B. meridionalis*.**

L'étude ECOBAM a permis de décrire pour la première fois **la composition taxonomique du microbiome cutané** de l'espèce *B. meridionalis* à l'échelle de son aire de répartition en France. Le microbiome est constitué majoritairement des phylums *Proteobacteria*, *Bacteroïdetes*, *Actinobacteria*, *Deinococcus-Thermus* et *Fusobacteria*. Il s'agit des phylums majoritaires du microbiome de la peau chez de nombreuses espèces poissons et notamment le hotu (*Chondrostoma nasus*) et le toxostome (*Parachondrostoma toxostoma*) dans les cours d'eau du bassin du Rhône (Guivier *et al.* 2019). Au regard de la composition taxonomique, cette différentiation est principalement structurée par l'abondance vs. absence du genre *Cetobacterium* (phylum *Fusobacteria*). Cette bactérie est quasi-absente dans le bactérioplancton mais peut atteindre des abondances relatives élevées dans le microbiome de BAM. Le genre *Cetobacterium* est bien décrit dans le microbiome intestinal chez de nombreuses espèces poissons du fait de son rôle métabolique. En effet, cette bactérie joue un rôle fonctionnel important dans la synthèse de la vitamine B12 mais aussi dans la régulation de la réponse inflammatoire et des défenses antibactérienne (Tsuchiya, Sakata & Sugita, 2007). Son abundance dans le microbiome de la peau a été décrite chez d'autres espèces comme le toxostome, le silure et le black bass (*Micropterus salmoides*) (Guivier *et al.*, 2019; Arias *et al.*, 2019; Chiarello *et al.*, 2019), bien que cette présence apparaisse surprenante sur ce tissu au vue de son métabolisme anaérobiose. La peau constitue la première barrière face aux bactéries pathogène. Du fait de son rôle dans les défenses immunitaires, la présence/absence de *Cetobacterium* pourrait être un indicateur pertinent dans les capacités immunitaires des populations BAM et plus généralement dans l'état de santé de cette espèce. Des perturbations de l'environnement telles qu'une élévation de la température ou un changement du pH constituent des stress physiologiques pour le poisson qui affecte la composition du microbiome (Sylvain *et al.*, 2016). La détection de déséquilibre de la composition taxonomique doit ainsi être le reflet de stress environnementaux pour l'espèce. Des travaux de recherche se développent en ce sens et certaines études proposent le ratio *Proteobacteria/Bacteroïdetes* comme mesure de ce déséquilibre (Legrand *et al.*, 2019; Krotman *et al.*, 2019). Dans notre étude nous notons spécifiquement un ratio P/B <1, pour les populations de l'Estéron, Ebron et Réal Martin qui pourrait être le signe de perturbations de l'environnement pour le BAM. Ces trois stations se caractérisent par la présence de rejets domestiques ou la présence de stations de traitements des eaux usées (voir fiche stations). Nous sommes dans les balbutiements de ces outils mais les résultats sont extrêmement prometteurs pour la surveillance des écosystèmes aquatiques et de l'état de santé des populations piscicoles.

Les bactéries pathogènes constituent également des stress environnementaux qui affectent l'équilibre de la composition du microbiome. Bien que nos données restent insuffisantes pour une analyse épidémiologique détaillée, nous détectons 3 pathogènes connus chez les cyprinidés et salmonidés dans diverses populations de BAM à l'échelle de l'aire

d'étude. Cette détection est indépendante d'un diagnostic visuel de symptômes sur la peau et signifie que ces pathogènes peuvent être détectés très précocement avant un épisode zoonotique. Nous ne concluons pas sur la pathogénicité de CP et CBc chez le Barbeau, mais nous mettons en lien sur le Réal Martin l'observation de lésions cutanées et la détection de Fc dans des proportions très élevées ($>37\%$). La carte de présence de ces bactéries pathogènes est une donnée intéressante de surveillance épidémiologique pour les acteurs de la gestion des populations piscicoles.

A une échelle locale, l'étude du microbiome permet de regrouper ou discriminer les populations BAM suivant leur cortège bactérien. Dans le bassin de la Durance la composition du microbiome permet de distinguer les populations BAM du Beynon qui elles-mêmes présentent une variation entre le site amont et aval (entre les deux stations se trouve un rejet de la cave coopérative). A l'inverse les populations de la Blème et du Chaffère, distante de 70 km, se regroupent par leur composition du microbiome. Ces regroupements de populations de Barbeau sur le critère de la composition du microbiome semblent être le reflet de conditions environnementales similaires de leur habitat, indépendamment de la distance géographique qui les séparent. Au sein de chaque zone géographique cette caractérisation doit permettre de participer à la définition d'unités de gestion piscicole. En outre, parmi les populations, mentionnées par l'étude de l'ADN mitochondrial, qui doivent faire l'objet d'une protection particulière, il faut mettre en évidence la présence importante de *F. columnare* sur les populations de la Blème, du Lez et du Vançon, de *C. piscichlamidia* sp. dans les douves de la forteresse de Salses et de *C. branchiomonas cysticola* sur la station des Encanaux. Ces premiers résultats constituent donc une première base de données importantes pour les futures études et plans de gestion des populations de cette espèce protégée.

Bibliographie ECOBAM

- Aquascop (2012) Indices biologiques sur la Vis et la Creuze au droit d'un ancien site minier. 16p.
- Andrews K, Good J, Miller M, Luikart G, Hohenlohe P. 2016. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nat Rev Genet* 17.
- Aralep. (2016). Etude piscicole des bassins versants de l'Ay et de l'Ozon. Phase 1. Recueil de données bibliographiques. 17p.
- Arias C.R., Ray L., Cai W. & Willmon E. (2019). Fish are not alone: characterization of the gut and skin microbiomes of Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*), Bluegill (*Lepomis macrochirus*), and Spotted Gar (*Lepisosteus oculatus*). *SDRP Journal of Aquaculture, Fisheries & Fish Science* 2, 1–15. <https://doi.org/10.25177/JAFFS.2.2.RA.459>
- ASCONIT Consultants (2009) Bilan de la qualité des eaux superficielles du bassin du Calavon - Coulon entre 1992 et 2008. Rapport au Parc Naturel du Lubéron. 68p + Annexes
- Avise J.C. *Phylogeography: the history and formation of species* (2000). Cambridge, MA : Harvard University Press.
- Baffie P., B. Tamagna (2007). Répartition et abondance d'une espèce d'intérêt communautaire ; le barbeau meridional (*B. meridionalis*. Risso 1826). Rapp. Conseil Supérieur de la Pêche de Lozère. 16p
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.
- Baras Etienne. (1992). Stratégies d'occupation du temps et de l'espace chez le barbeau fluviatile, *Barbus barbus* (L.). *Cahiers d'Ethologie*, 12 (2-3) : 125-442
- Berrebi P., Cattaneo-Berrebi G. (1993). Natural hybridization of two species of tetraploid barbels: *Barbus meridionalis* and *Barbus barbus* (Osteichtyes, Cyprinidae) in southern France. *Biological Journal of the Linnean Society*, 48, 319-333.
- Berrebi P., Lamy G., Cattaneo-Berrebi G., Renno J-F., 1988. Variabilité génétique de *B. meridionalis*. Une espèce quasimonomorphe. *Bull. Fr. Pêche et Pisciculture* , 310 : 77-84
- Blaive P. 1933-34. Une nouvelle station de barbeau méridional (*Barbus meridionalis* Risso) en méditerranée. *Trav. Lab. Hydrobiol. Piscic. Univ-Grenoble* : 181-186
- Bordenstein S.R. & Theis K.R. (2015). Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLOS Biology* 13, e1002226. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>

- Bouchard P. (1996) Microhabitat des Cyprinidés dans une rivière méditerranéenne fortement aménagée: la Durance. Aix Marseille I. 96p
- Boutin S., Sauvage C., Bernatchez L., Audet C. & Derome N. (2014). Inter individual variations of the fish skin microbiota: host genetics basis of mutualism? *PLoS ONE* 9, e102649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102649>
- Changeux T. et D. Pont (1995). Current status of the riverine fishes pf the french mediterranean basin. *Biological Conservation* 72 (1995) 137-158
- Charvet A., et M., Scaramuzzi 2015. Suivi des bio-indicateurs du Parc Naturel Régional du Pilat : populations d'écrevisse à pieds blancs et de barbeau méridional, 53p + Annexes.
- Chiarello M., Paz-Vinas I., Veyssiére C., Santoul F., Loot G., Ferriol J., et al. (2019). Environmental conditions and neutral processes shape the skin microbiome of European catfish (*Silurus glanis*) populations of Southwestern France. *Environmental Microbiology Reports* 11, 605–614. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12774>
- Corse E. (2009) Hybridation et conséquences évolutive chez deux espèces du genre *Chondrostoma* en Durance : aspects trophiques. Thèse Région/ SMAVD, Aix Marseille Université.
- Crespin L., Berrebi P., Lebreton J. (2002) Spatially varying natural selection in a fish hybrid zone. *Journal of Fish Biology*. 61(3), 696–711.
- Crespin L., Berrebi P., Lebreton J.D. (1999). Asymmetrical introgression in a freshwater fish hybrid zone as revealed by a morphological index of hybridization. *Biological Journal of the Linnean Society*. 67(1), 57–72.
- Crespin L., P., Berrebi. 1994. L'hybridation naturelle entre le barbeau commun et le barbeau meridional en France: compte rendu de dix années de recherche. *Bull. Fr. Pêche et Pisciculture*, 334 : 177-189
- Cruaud P., Vigneron A., Fradette M.-S., Dorea C.C., Culley A.I., Rodriguez M.J., et al. (2019). Annual bacterial community cycle in a seasonally ice-covered river reflects environmental and climatic conditions: Microbial ecology of an ice-covered river. *Limnology and Oceanography*. <https://doi.org/10.1002/limo.11130>
- De Kinkelin P., Ch. Michel, P. Ghittino. (1985). Précis de pathologie des poissons. INRA OIE 348p.
- Declercq A.M., Haesebrouck F., Van den Broeck W., Bossier P. & Decostere A. (2013). Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. *Veterinary Research* 44, 27. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-27>

DOCOB FR 9301519. (2010- 284-3) Fiches actions : A11 : Maintenir ou restaurer les habitats favorables aux poissons présentant un fort Enjeux et E5 : améliorer les connaissances des populations de Barbeau méridional, notamment du point de vue génétique (croisement Barbeau méridional x Barbeau fluviatile) : 77p

Dorfliger N., Schoen R., Giroux H. avec la collaboration de Bakalowicz M., Lachassagne P., Ladouce B. et Marchal JP. (2001) - Évaluation des ressources en eau souterraine des systèmes karstiques des Corbières; Sous-phase CORBOI « État des connaissances hydrogéologiques des Corbières ». Rap. BRGM RP-51103-FR, 93 p., 12 fig., 2 annexes.

Dorier A. 1957. Carte piscicole de l'Ardèche. *Trav. Lab. Hydrobiol. Piscicult.* Grenoble

Dorier A., (1957) Répartition du Barbeau méridional (*Barbus meridionalis* Risso) dans le sud-est de la France. *Trav. Lab. Hydrobiol. Piscicult.* Grenoble. 141-149.

Dorier, A. (1954). Carte piscicole du département de la Drôme. *Travaux du Laboratoire de Pisciculture de l'Université de Grenoble.*

Dubut V, Fouquet A, Voisin A, Costedoat C, Chappaz R, Gilles A. (2012) From Late Miocene to Holocene: Processes of Differentiation within the Teleost Genus (Actinopterygii: Cyprinidae). *PLoS ONE* 7(3): e34423. doi:10.1371/journal.pone.0034423

Elshire R, Glaubitz J, Sun Q, Poland J, Kawamoto K, Buckler E, Mitchell S. 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PloS One* 6: e19379.

Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2007). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.

Fédération Départementale de Pêche de l'Ardèche et Conseil Supérieur de la Pêche (2003) Etude sur la répartition du Barbeau méridional (*Barbus meridionalis*) dans les Monts d'Ardèche 31p + Annexes

Fraser D.J. & Bernatchez L. (2001). Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* 10, 2741–2752

Fu, Y. X., & Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133(3), 693–709.

Fuhrman J.A. (2009). Microbial community structure and its functional implications. *Nature* 459, 193–199. <https://doi.org/10.1038/nature08058>

Gay Cabinet. 2014. Bilan départemental de la qualité des cours d'eau. Année 2013. Bassin versant de l'Ebron.62p. + annexes

- Gettova, L., Gilles, A., Simkova, A. (2016). Metazoan parasite communities: support for the biological invasion of *Barbus barbus* and its hybridization with the endemic *Barbus meridionalis*. *Parasites and Vectors*, 9: 588.
- Gilles A., C. Costedoat, B. Barascud, A. Voisin, P. Banarescu, P.G. Bianco, P.S. Economidis, D. Marić, & R. Chappaz. 2010. Speciation pattern of *Telestes souffia* complex (Teleostei, Cyprinidae) in Europe using morphological and molecular markers. *Zoologica Scripta*, 39 : 225-242.
- Ginelli Ludovic. 2017. Jeux de nature, natures en jeu. Des loisirs aux prises avec l'écologisation des sociétés. P.I.E Peter Lang S. A. éd.238p.
- Gleize M. 2009. Etude des populations de barbeau méridional du département du Rhône, 2009, Rapport de stage Université Blaise Pascal et Fédération départementale de pêche du Rhône. 72p
- Gougnard I., Poncin P., Ruwet J.C., Philippart J.C., 1987. Description et analyse du comportement de reproduction du barbeau *Barbus barbus* (L.) en aquarium. Influence du nombre de mâles courtisants sur les comportements observés. *Cah. Ethol. appt.*, 7(3), 293-302.
- Guivier E., Martin J.-F., Pech N., Ungaro A., Chappaz R. & Gilles A. (2018). Microbiota diversity within and between the tissues of two wild interbreeding species. *Microbial Ecology* 75, 799–810. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1077-9>
- Guivier E., Pech N., Chappaz R. & Gilles A. (2019). Microbiota associated with the skin, gills, and gut of the fish *Parachondrostoma toxostoma* from the Rhône basin. *Freshwater Biology* : 1-14
- Jendarme J. (1991) Etude préliminaire du comportement d'hybridation de *Barbus barbus* (L.) et *Barbus meridionalis* (R.) en aquarium. Mémoire Lic. Sc. Zol. Université de Liège, 55p + annexes.
- Kalinowski S.T. (2004) Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics* 5:539-543
- Kalinowski, S. T. (2005). hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 187–189.
- Kiener A., A. Delize , P. Belkior, (1981). Aspects piscicoles du fleuve Argens (Var). *Bull. Fr. Pêche Pisci.*, 282, 43-74
- Kotlik P and Berrebi P (2001). Phylogeography of the barbel (*Barbus barbus*) assessed by mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, 10(9), 2177-2185.

- Kraiem, M.M. (1980). Structure et fonctionnement des écosystèmes du Haut Rhône français. Contribution à l'étude du régime alimentaire de *Barbus barbus* (L.) *Bull. Fr. Pisci.*, 53 : 145-180
- Krotman Y., Yergaliyev T.M., Alexander R.S., Avrahami Y. & Szitenberg A. (2019). Dissecting the factors shaping fish skin microbiomes in a heterogeneous inland water system. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/739748>
- Le Brun N. 1989. Spécificité des relations hôtes-parasites : le modèle Cyprinidae- Diplozoon. *Bull. Ecol.*, 20, 86-88
- Le Coarer Y., Testi B., Prost O., (2014). Détermination des préférences d'habitats du Barbeau méridional Echantillonnage piscicole sur les Paillons. Rapport IRSTEA-Agence de l'Eau. 36p + Annexes
- Léger L. 1910. Sur la présence du Barbeau méridional dans les Alpes du Dauphiné. *Trav. Lab. Hydrobiol. Piscic. Univ. Grenoble* Fasc.1, 7p., 1pl.
- Legrand T.P.R.A., Wynne J.W., Weyrich L.S. & Oxley A.P.A. (2019). A microbial sea of possibilities: current knowledge and prospects for an improved understanding of the fish microbiome. *Reviews in Aquaculture*. <https://doi.org/10.1111/raq.12375>
- Maison Régionale de l'Eau (2017). Les petits côtiers en Région PACA. *Les Cahiers de la Maison Régionale de l'Eau* 118p.
- Maison Régionale de l'Eau (2018). Des sources triasiques en Région PACA. *Les Cahiers de la Maison Régionale de l'Eau* 112p.
- Marková S., Šanda R., Crivelli A., Shumka S., Wilson I.F., Vukić J., Berrebi P., Kotlík P. (2010). Nuclear and mitochondrial DNA sequence data reveal the evolutionary history of *Barbus* (Cyprinidae) in the ancient lake systems of the Balkans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 488-500.
- Narum S, Buerkle C, Davey J, Miller M, Hohenlohe P. 2013. Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics. *Mol Ecol* 22.
- Nowak M, Pedersen ATM, Brysting AK, Schrøder-Nielsen A, Elven R, Bjørå CS. 2020. Testing hypotheses of hybrid origins for two seashore species of *Carex* section *Phacocystis* (Cyperaceae). *Bot J Linn Soc* 194: 100–117.
- Nunes J, Liu S, Pértille F, Perazza C, Villela P, Almeida-Val V, Hilsdorf A, Liu Z, Coutinho L. 2017. Large-scale SNP discovery and construction of a high-density genetic map of *Colossoma macropomum* through genotyping-by-sequencing. *Sci Rep* 7: 46112.

- Persat H., P. Berrebi. 1990. Relatives ages of present populations of *B. barbus* and *B. meridionalis* in southern France: preliminary considerations. *Aquat. Living Resour.* 3, 253-263
- Philippart J.C. et Berrebi P. (1990) Experimental hybridization of *Barbus barbus* and *Barbus meridionalis* : physiological, morphological and genetics aspects. *Aquat. Living resources*, 3 (4) : 251-336.
- Poncin P., 1994. Bilan de 4 années d'étude du comportement reproducteur et de l'hybridation chez *B. barbus* (L.1758) et *B. meridionalis* (Risso, 1926). *Bull. Fr. Pêche Piscic.* (1994) 334 : 169-176
- Pouyaud L. 1990. Ethologie, Ecologie et génétique de *B. barbus* et *B. meridionalis* sur la Lergue, affluent de l'Hérault. DEA Université de Montpellier 2. 39p.
- Robe A., et A. Corbarieu (2012). Indices biologiques dans la Vis et la Crenze au droit d'un ancien site minier. Résultats de la campagne de juin 2012. Rapp. Aquascop 16p + Annexes
- Roset N., L. Marion ; Suivi des populations piscicoles à forte valeur patrimoniale sur le bassin versant de la Drôme et du haut Roubion. Rapp. Communauté de Commune du Val de Drôme 97p
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299–3302.
- SAGE environnement. 2016. Observatoire de l'Eau et des Milieux Aquatiques dans le cadre du Contrat de Rivières Sud Grésivaudan Aire de répartition du Barbeau méridional. 44p + Annexes
- Sevellec M., Derome N. & Bernatchez L. (2018). Holobionts and ecological speciation: the intestinal microbiota of lake whitefish species pairs. *Microbiome* 6. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0427-2>
- Simon J.-C., Marchesi J.R., Mougel C. & Selosse M.-A. (2019). Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome* 7. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0619-4>
- SIRCC. 2015. Contrat de rivière Calavon Coulon. 89p + Annexes
- SOGREAH, ASCONIT. 2011. Etudes d'estimation des volumes prélevables globaux, bassins versants du Sud Grésivaudan.
- SORIC, V. & D. JANKOVIC, 1989. Characteristics of growth and sexual maturity of *Barbus meridionalis*. *Ichthyologia* 21(1):27-37.

Sylvain F.-É., Cheaib B., Llewellyn M., Gabriel Correia T., Barros Fagundes D., Luis Val A., et al. (2016). pH drop impacts differentially skin and gut microbiota of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Scientific Reports* 6, 32032. <https://doi.org/10.1038/srep32032>

Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105(2), 437–460.

Trevelline B.K., Fontaine S.S., Hartup B.K. & Kohl K.D. (2019). Conservation biology needs a microbial renaissance: a call for the consideration of host-associated microbiota in wildlife management practices. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 286, 20182448. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2448>

Tsigenopoulos, C. S., Berrebi, P. (2000). Molecular phylogeny of North Mediterranean freshwater barbs (genus *Barbus*: Cyprinidae) inferred from cytochrome b sequences: biogeographic and systematic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14, 165-179.

Tsuchiya C., Sakata T. & Sugita H. (2007). Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology* 0, 071018031740002- <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02258.x>

West A.G., Waite D.W., Deines P., Bourne D.G., Digby A., McKenzie V.J., et al. (2019). The microbiome in threatened species conservation. *Biological Conservation* 229, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.11.016>

Wiik-Nielsen J., Gjessing M., Solheim H.T., Litlabø A., Gjevre A.-G., Kristoffersen A.B., et al. (2017). Ca . *Branchiomonas cysticola*, Ca . *Piscichlamydia salmonis* and Salmon Gill Pox Virus transmit horizontally in Atlantic salmon held in fresh water. *Journal of Fish Diseases* 40, 1387–1394. <https://doi.org/10.1111/jfd.12613>