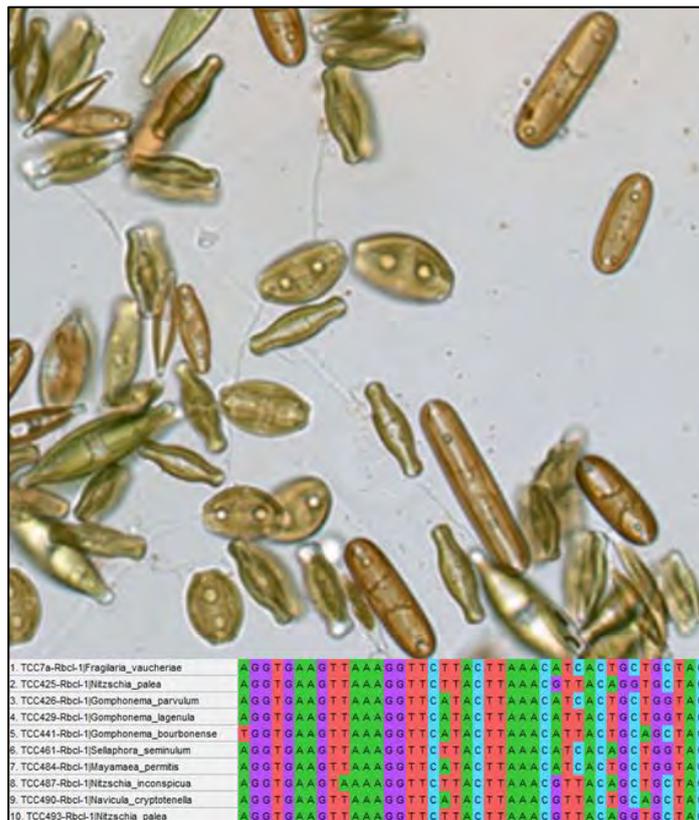


Rapport final

Projet : Utilisation de l'ADN environnemental des diatomées comme outil de biomonitoring pour la conservation des Rivières Sauvages (2020-2022)

**Application aux bassins versants :
Estéron, Clu d'Amen, Vallon de Cante, Cians, Roudoule**



Structure porteuse :

SMIAGE

Nombre de stations suivies :

8 stations sur le BV de l'Estéron

2 stations sur le BV du Clu d'Amen

2 stations sur le BV du Vallon de Cante

5 stations sur le BV du Cians

3 stations sur le BV de la Roudoule

Mai 2022

Valentin Vasselon – SCIMABIO Interface

1. INTRODUCTION

Les acteurs du réseau Sites Rivières Sauvages ont pour objectif commun d'améliorer la protection et la conservation des rivières qui présentent un bon fonctionnement écologique. Ce travail passe par le suivi de nombreux indicateurs et métriques (chimiques, physiques, biologiques...) qui renseignent sur le niveau de conservation et l'état des cours d'eau.

Parmi les paramètres biologiques suivis, les groupes indicateurs recommandés par la Directive Cadre sur l'Eau (DCE), comme les diatomées, sont couramment utilisées pour évaluer l'état écologique des milieux. Les notes d'état écologique dérivées des inventaires d'espèces via le calcul d'indice type IBD (Indice Biologique Diatomées) servent à évaluer un état général face à des pressions spécifiques (nutriments, matière organiques...) liées en partie à la présence d'activités anthropiques (élevage, agriculture, STEP, urbanisation...).

A l'échelle du réseau Rivières Sauvages, les rivières labellisées sont généralement localisées en tête de bassin versant avec peu voire pas d'influences anthropiques. De ce fait les évaluations d'état écologique classent généralement ces sites en « bon » ou « très bon » état, mais ne permettent pas de suivre des changements fins dans les communautés de diatomées qui pourraient renseigner sur le niveau de conservation du milieu.

C'est dans ce contexte que le projet ADNe diatomées (2020-2022) a été proposé sur plusieurs rivières du réseau Rivières Sauvages afin de :

- Caractériser les communautés diatomées présentes via des approches morphologique (microscopie) et moléculaire (métabarcoding ADN)
- Evaluer l'opérationnalité de l'approche ADNe diatomées en termes de bio-indication dans le contexte des cours d'eau RS
- Identifier des taxons ou communautés pouvant être suivis à terme comme des indicateurs en appui à la conservation de ces milieux

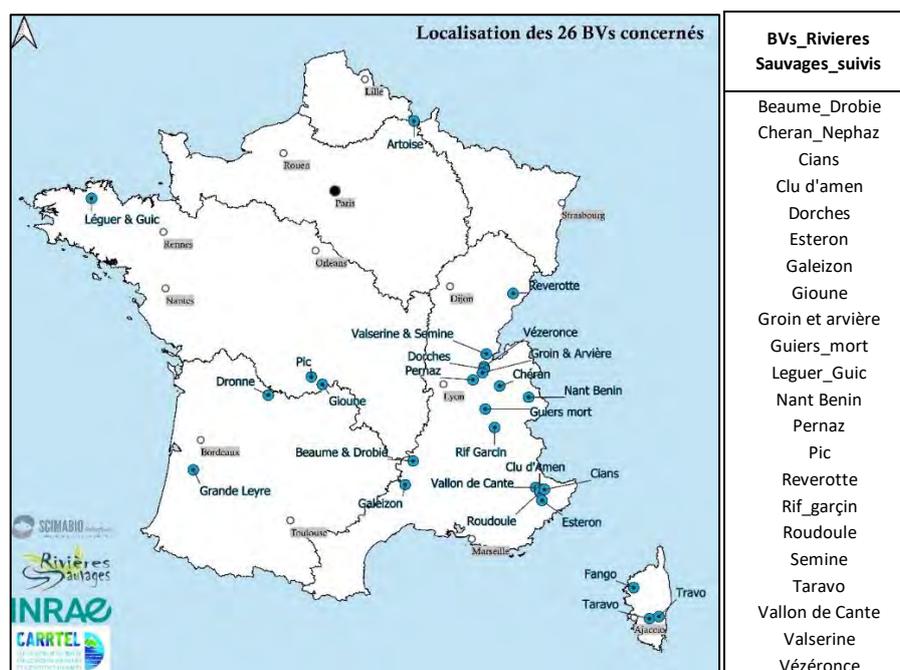


Fig. 1 – Localisation des 26 BVs rivières sauvages initialement impliqués dans le projet ADNe diatomées et la liste des BVs suivis lors des campagnes de terrain 2020-2021.

Ce projet initialement construit à l'échelle de 26 BVs Rivières Sauvages (Fig. 1) a pu être réalisé sur 23 rivières avec plus de 160 stations suivies lors de 2 campagnes de terrain réalisées en 2020 et 2021. Une note technique initiale ainsi qu'un rapport intermédiaire présentant les données de la campagne de terrain 2020 ont été communiqués au cours de l'avancement du projet.

Ce document constitue le rapport final de l'étude permettant de présenter les résultats obtenus lors de la campagne de terrain 2021 à l'échelle des BVs de l'Estéron, du Clu d'Amen, du Vallon de Cante, du Cians et de la Roudoule. L'analyse de l'ensemble des données obtenues à l'échelle des BVs et leur confrontation avec les données ADNe diatomées historiques disponibles sur plusieurs centaines de stations du réseau DCE national en rivières.

2. Rappels méthodologiques

a. Stations étudiées

Après validation avec les acteurs locaux, 20 stations ont été sélectionnées sur les 5 BVs. Les stations ont été positionnées en tenant compte de plusieurs paramètres comme l'accessibilité, la prise en compte des caractéristiques et pressions du BV (affluents, zones urbanisées, station d'épuration, couverture du sol...), tout en ayant une couverture optimale du linéaire labelisé (Fig. 2).

b. Echantillonnage

Les biofilms aquatiques contenant les communautés benthiques de diatomées ont été échantillonnés lors de 2 campagnes de terrain réalisées en 2020 et 2021 durant la période d'étiage (entre Mai et Septembre). Ces prélèvements ont été réalisés par la structure porteuse du projet en suivant les recommandations de la note technique basées sur la méthode normalisée DCE pour le suivi de l'état écologique des cours d'eau via les diatomées (NF T90-354 Afnor 2016¹).

Les recommandations normatives ont été rappelées dans la note technique fournie au début du projet. Pour rappel, au moins 5 substrats (pierres) sont récupérés à l'échelle de chaque station sur des zones de radiers et laisser à égoutter sur la berge (Fig. 3). Le biofilm est alors collecté en frottant la surface des substrats et récupéré dans une cuvette contenant de l'éthanol (>95%). A la fin de l'échantillonnage le mélange éthanol/biofilm obtenu est transféré dans un flacon et complété avec de l'éthanol pour avoir une concentration finale >70%.

¹ Afnor. (2016). Norme Française NFT 90-354. Qualité de l'eau - Échantillonnage, traitement et analyse de diatomées benthiques en cours d'eau et canaux.

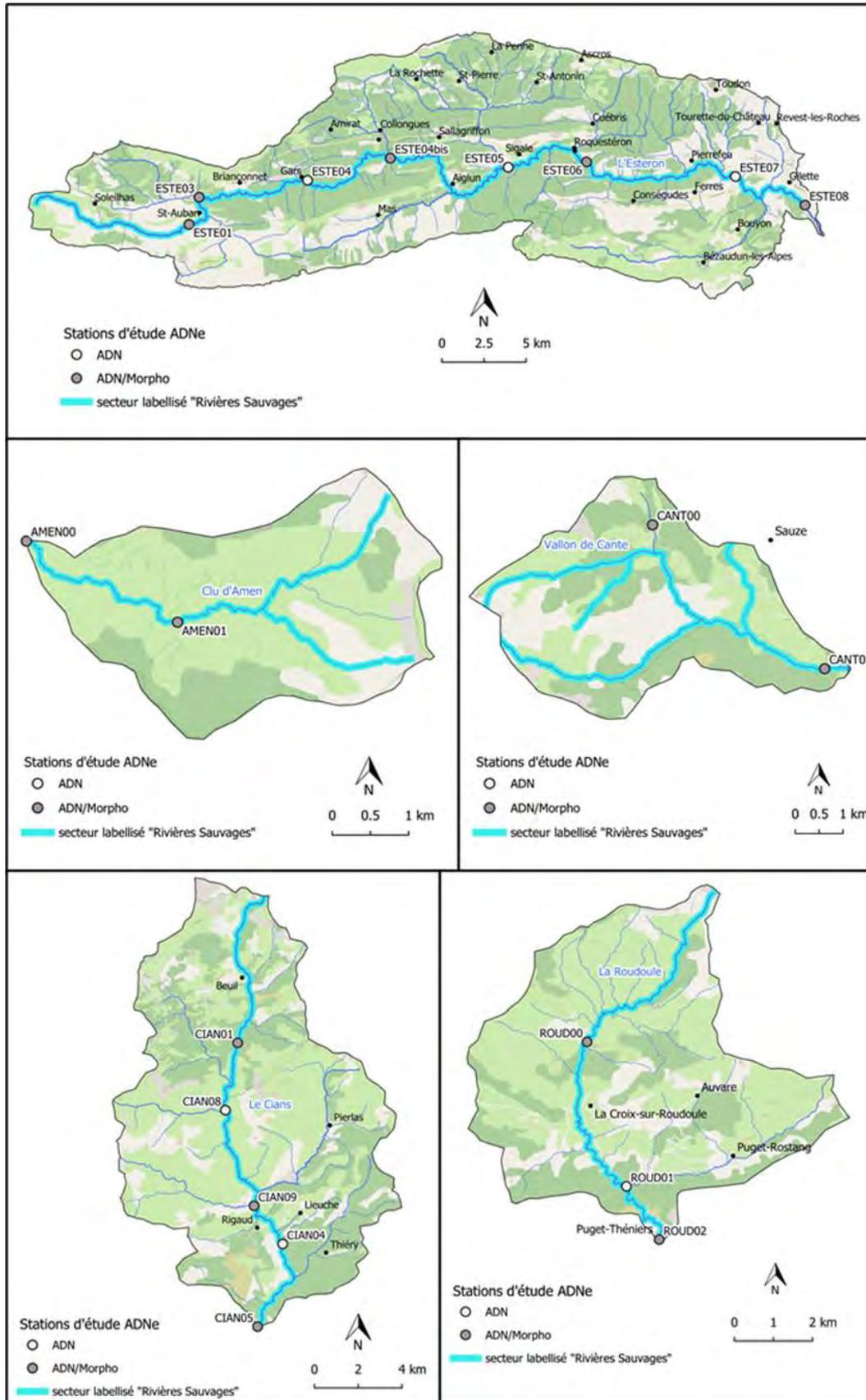


Fig. 2 – Localisation des 20 stations échantillonnées sur les BVs de l'Estéron, du Clu d'Amen, du Vallon de Cante, du Cians et de la Roudoule. Les stations ont toutes été suivies avec l'approche moléculaire (2020 et 2021), les stations en gris ont été suivies avec l'approche morphologique (2020).

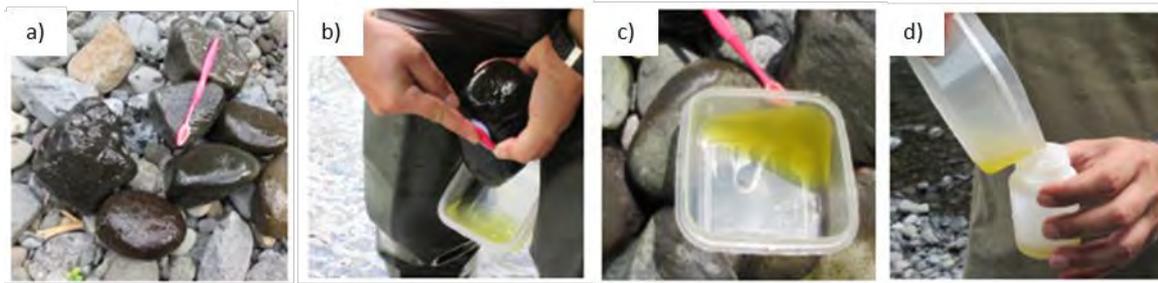


Fig. 3 – Etapes clés de l'échantillonnage de biofilm aquatiques : a) collecte des substrats (pierres), b) récupération du biofilm en frottant la surface des substrats dans une cuvette contenant de l'éthanol, c) récupération du biofilm fixé à l'éthanol (>70% final).

L'utilisation d'éthanol permet de préserver les échantillons de biofilm ainsi que l'ADN, permettant de mettre en place les approches morphologique et moléculaire pour réaliser les inventaires de diversité diatomées. Chaque échantillon a ensuite été séparé en 2 lots : un pour la mise en place des approches morphologiques en microscopie et l'autre pour la mise en place de l'approche moléculaire en métabarcoding.

c. Approche morphologique en Microscopie

Les inventaires taxonomiques diatomées obtenus en microscopie ont été réalisés par la structure porteuse du projet en suivant la méthode décrite dans la norme AFNOR NF T90-354 rappelée dans la note technique fournie au démarrage de l'étude. Les étapes principales de la réalisation sont présentées dans la *Figure 4*.

Pour rappel, plusieurs traitements chimiques sont nécessaires pour préparer les échantillons de biofilm, incluant : une étape de dégradation de la matière organique en présence de peroxyde d'oxygène, la dissolution de la matière minérale comme les carbonates de calcium en présence d'acide (e.g. acide chlorhydrique) et plusieurs de rinçage à l'eau déminéralisée.

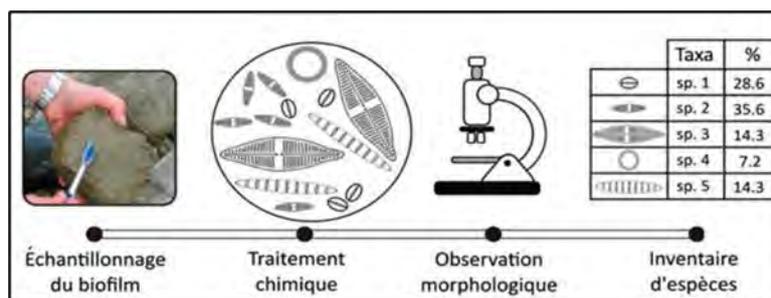


Fig.4 – Rappel des principales étapes de l'approche morphologique en microscopie pour réaliser un inventaire diatomique à partir d'un échantillon de biofilm.

Une fois les traitements chimiques terminés, la préparation obtenue contient principalement les frustules des diatomées, paroi de silice servant à protéger la cellule et permettant l'identification des espèces. Une partie de la préparation est déposée sur une lame de microscope mise à chauffer pour évaporer l'eau, puis une résine est appliquée pour fixer les frustules sur la lame de manière permanente (Fig. 5).



Fig.5 – Observation microscopique (x1000) d'un échantillon de biofilm après traitements chimiques. Présence de frustules de silices appartenant à différentes espèces de diatomées.

Chaque préparation est examinée au microscope (grossissement x1000) et 400 unités diatomiques sont comptées et identifiées pour dresser un inventaire taxonomique. La détermination est faite par identification morphologique des frustules, dans la mesure du possible jusqu'à l'espèce, en utilisant des guides d'identifications (atlas floristiques, littérature classique sur les diatomées européenne...). Pour la suite des analyses, les inventaires taxonomiques fournis en nombre de frustules sont convertis en % de frustule (Annexe 1).

Pour garder la cohérence avec les données de l'ensemble des BVs Rivières Sauvages, seuls les inventaires morphologiques obtenus pour les échantillons de la campagne de terrain 2020 ont été analysés (voir rapport intermédiaire de campagne 2020).

d. Approche moléculaire

Les inventaires taxonomiques diatomées obtenus en métabarcoding ADN ont été réalisés par le bureau d'étude « Scimabio-Interface » (2020, 2021). Cette approche innovante repose sur plusieurs étapes clés rappelées dans la Figure 6.

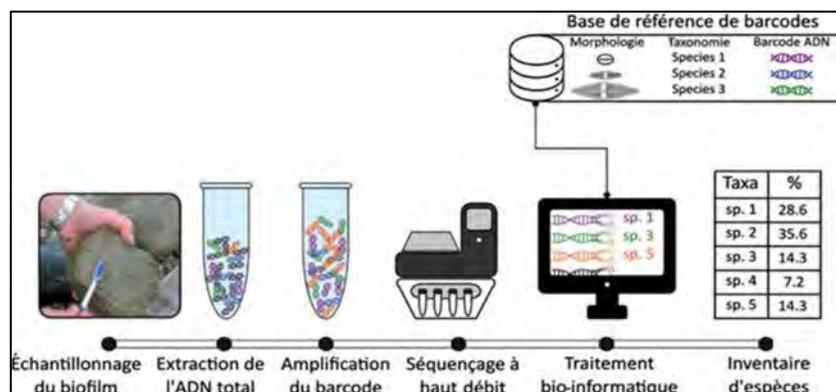


Fig.6 – Rappels des principales étapes l'approche moléculaire (métabarcoding ADN) pour réaliser un inventaire diatomique à partir d'un échantillon de biofilm.

De manière synthétique, l'ADN total présent dans les biofilms est composé à la fois de l'ADN issus des différents groupes biologiques vivants dans le biofilm (e.g. bactéries, diatomées, champignons, macroinvertébrés...) ainsi que de l'ADN relargué sous différentes formes (e.g. cellules mortes, fèces, gamètes...) par des organismes ne vivants pas dans le biofilm (e.g. poissons, végétaux, mammifères) et piégé dans le biofilm.

L'extraction de l'ADN total du biofilm repose sur un protocole de biologie moléculaire adapté (Nucleospin Soil, Macherey-Nagel) comprenant des étapes : de lyse mécanique de l'échantillon et des cellules (bille de céramique), de purification et de précipitation de l'ADN sur colonne de silice. L'ADN total obtenu est ainsi concentré et purifié de tous les éléments pouvant être co-extraits comme des matières organiques et minérales, des débris cellulaires, ou encore des molécules dissoutes présentes naturellement dans le milieu.

Afin de ne travailler que sur le signal ADN des diatomées contenu dans l'ADN total extrait, un court fragment d'ADN spécifique aux diatomées (gène *rbcl*, région de 312 nucléotides) est utilisé comme barcode et amplifié par réaction enzymatique lors d'une PCR (Polymerase Chain Reaction). Le produit obtenu à l'issue de la PCR est ainsi majoritairement composé de séquences ADN *rbcl* des diatomées (barcodes) qui peut être séquencé, permettant d'étudier informatiquement les séquences ADN (Fig. 7).

1. TCC7a-Rbcl-1 Fragilaria_vaucheriae	A	G	G	T	G	A	A	G	T	T	A	A	A	G	G	T	T	C	T	T	A	A	A	C	A	T	C	A	C	T	G	C	T	A	C							
2. TCC425-Rbcl-1 Nitzschia_palea	A	G	G	T	G	A	A	G	T	T	A	A	A	G	G	T	T	C	T	T	A	A	A	C	G	T	T	A	C	A	G	G	T	G	C	T	A	C				
3. TCC426-Rbcl-1 Gomphonema_parvulum	A	G	G	T	G	A	A	G	T	T	A	A	A	G	G	T	T	C	A	T	A	C	T	T	A	A	A	C	A	T	C	A	C	T	G	C	T	G	G	T	A	C
4. TCC429-Rbcl-1 Gomphonema_lagenula	A	G	G	T	G	A	A	G	T	T	A	A	A	G	G	T	T	C	A	T	A	C	T	T	A	A	A	C	A	T	T	A	C	T	G	C	T	G	G	T	A	C
5. TCC441-Rbcl-1 Gomphonema_bourbonense	T	G	G	T	G	A	A	G	T	T	A	A	A	G	G	T	T	C	A	T	A	C	T	T	A	A	A	C	A	T	T	A	C	T	G	C	A	G	C	T	A	C
6. TCC461-Rbcl-1 Sellaphora_seminulum	A	G	G	T	G	A	A	G	T	T	A	A	A	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	A	A	A	C	A	T	C	A	C	A	G	C	T	G	G	T	A	C
7. TCC484-Rbcl-1 Mayamaea_permitis	A	G	G	T	G	A	A	G	T	T	A	A	A	G	G	T	T	C	A	T	A	C	T	T	A	A	A	C	A	T	C	A	C	T	G	C	T	G	G	T	A	C
8. TCC487-Rbcl-1 Nitzschia_inconspicua	A	G	G	T	G	A	A	G	T	T	A	A	A	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	A	A	A	C	G	T	T	A	C	A	G	C	T	G	C	T	A	C
9. TCC490-Rbcl-1 Navicula_cryptotenella	A	G	G	T	G	A	A	G	T	T	A	A	A	G	G	T	T	C	A	T	A	C	T	T	A	A	A	C	G	T	T	A	C	T	G	C	A	G	C	T	A	C
10. TCC493-Rbcl-1 Nitzschia_palea	A	G	G	T	G	A	A	G	T	T	A	A	A	G	G	T	T	C	T	T	A	C	T	T	A	A	A	C	G	T	T	A	C	A	G	G	T	G	C	T	A	C

Fig.7 – Séquences ADN *rbcl* de différentes espèces de diatomées. Les lettres correspondent aux 4 nucléotides constitutifs de l'ADN (A : adénine, T : thymine, C : cytosine, G guanine).

Grâce à des outils bio-informatiques, les séquences ADN environnementales ainsi obtenues après séquençage sont comparées à une base de données génétiques de référence (Diat.barcode²) afin de leur attribuer une taxonomie. La liste des séquences assignées taxonomiquement est ensuite transformée en un inventaire taxonomique moléculaire fournis en % de séquences (Annexe 1).

e. Données acquises et identification des stations

Au cours de cette étude, un total de 325 biofilms a pu être collecté lors des campagnes de prélèvements 2020 (159 stations) et 2021 (166 stations) sur l'ensemble des BVs Rivières Sauvages impliqués (Fig. 8). Les mêmes stations ont été échantillonnées au cours des 2 campagnes afin d'avoir un aperçu de la variabilité temporelle des communautés de diatomées.

² <https://www6.inrae.fr/carrtel-collection/Barcoding-database>

BVs_Rivieres Sauvages	Nb. stations suivies		Code Projet	BV	Riviere	Code station	Stations suivies		Coordonnées GPS		
	2020	2021					2020	2021	X	Y	Format
Beaume_Drobie	-	10	RS045	Esteron	Esteron	ESTE01	x	-	43.842618	6.718494	DD (deg. dec.)
Cheran_Nephaz	14	15	RS046	Esteron	Esteron	ESTE03	x	x	43.857046	6.726827	DD (deg. dec.)
Cians	5	5	RS047	Esteron	Esteron	ESTE04	x	x	43.863464	6.807547	DD (deg. dec.)
Clu_d_amen	2	2	RS048	Esteron	Esteron	ESTE04bis	x	x	43.873297	6.869495	DD (deg. dec.)
Dorches	4	4	RS049	Esteron	Esteron	ESTE05	x	x	43.865249	6.956226	DD (deg. dec.)
Esteron	8	7	RS050	Esteron	Esteron	ESTE06	x	x	43.866032	7.014266	DD (deg. dec.)
Galeizon	9	9	RS051	Esteron	Esteron	ESTE07	x	x	43.8540519	7.1236283	DD (deg. dec.)
Gioune	7	7	RS052	Esteron	Esteron	ESTE08	x	x	43.836602	7.173930	DD (deg. dec.)
Groin_Arviere	9	8	RS053	Clu_d_amen	Clu_d_amen	AMEN00	x	x	44.0537706	6.8491894	DD (deg. dec.)
Guiers_mort	13	12	RS054	Clu_d_amen	Clu_d_amen	AMEN01	x	x	44.0431906	6.8731978	DD (deg. dec.)
Leguer_Guic	18	18	RS055	Vallon_de_Cante	Vallon_de_Cante	CANT00	x	x	44.091639	6.805250	DD (deg. dec.)
Nant_benin	6	6	RS056	Vallon_de_Cante	Vallon_de_Cante	CANT01	x	x	44.062528	6.848333	DD (deg. dec.)
Pernaz	4	4	RS057	Cians	Cians	CIAN01	x	x	44.067583	6.985556	DD (deg. dec.)
Pic	6	6	RS058	Cians	Cians	CIAN04	x	x	43.982861	7.005333	DD (deg. dec.)
Reverotte	5	5	RS059	Cians	Cians	CIAN05	x	x	43.948944	6.988611	DD (deg. dec.)
Rif_garcin	8	8	RS060	Cians	Cians	CIAN08	x	x	44.039806	6.976583	DD (deg. dec.)
Roudoule	3	3	RS061	Cians	Cians	CIAN09	x	x	43.999306	6.990167	DD (deg. dec.)
Semine	9	8	RS062	Roudoule	Roudoule	ROUD00	x	x	44.002213	6.874213	DD (deg. dec.)
Taravo	12	12	RS063	Roudoule	Roudoule	ROUD01	x	x	43.968083	6.884472	DD (deg. dec.)
Vallon_de_cante	2	2	RS064	Roudoule	Roudoule	ROUD02	x	x	43.955303	6.894058	DD (deg. dec.)
Valserine	12	12									
Vezeronce	3	3									
Total	159	166	Total				20	19			

Fig.8 – Codification et coordonnées GPS des 20 stations au regard de l'ensemble des données acquises sur le réseau Rivières Sauvages.

A l'échelle des 5 BVs, les 20 stations ont pu être échantillonnées correctement au cours des 2 campagnes de prélèvement (Fig. 2, 8). L'échantillon de biofilm prélevé en 2021 sur la station RS045 (ESTE01) a pu être séquencé, mais le nombre de séquences ADN obtenues en sortie de séquençage était trop faible pour caractériser correctement la communauté de diatomées. Ceci est dû au fait qu'il y avait peu de diatomées dans l'échantillons d'origine (biofilm peu développé). Cet échantillon a donc été retiré de l'analyse.

Afin d'homogénéiser les analyses globales entre BVs Rivières Sauvages et les données métabarcoding ADN historiques collectées à l'échelle du territoire, un code projet global a été utilisé pour identifier les stations (Fig. 8).

3) Considérations méthodologiques

Bien que les taxons diatomées détectés en 2020 par les approches morphologique et moléculaire soient cohérents entre eux, des différences sont observables dans les inventaires taxonomiques. Ces deux approches reposant sur des stratégies différentes pour caractériser les communautés de diatomées (Fig.4, 6), en fonction de leur variabilité génétique (métabarcoding ADN) et de leur variabilité taxonomique (microscopie), il est normal et attendu d'avoir des écarts dans la détection et la quantification relative des taxons de diatomées.

Les écarts dans les dominances de certains taxons sont liés aux biais méthodologiques des deux approches. C'est notamment dû au fait que l'approche morphologique tend à mieux détecter les espèces avec un petit volume cellulaire généralement plus abondantes en

nombre d'individus, tandis que l'approche moléculaire tend à mieux détecter les espèces avec un grand biovolume cellulaire qui possèdent plus de copies du gène ciblé en métabarcoding. De plus il est important de préciser que la quantification par l'approche moléculaire ne permet pas d'évaluer des changements en termes de nombre d'individus, seulement des changements relatifs dans les assemblages qui restent donc à interpréter avec prudence.

Les assignations taxonomiques obtenues par les deux approches peuvent aussi être affectées par différents biais méthodologiques comme : l'homogénéité des connaissances taxonomiques, la complétion de la base de référence génétique Diat.barcode, les capacités de détection des 2 approches... (voir *Vasselon et al. 2019*³ pour plus de précisions). L'accumulation de ces écarts méthodologiques aboutit logiquement à la production d'inventaires taxonomiques morphologiques et moléculaires qui peuvent diverger en fonction des complexités d'assemblages. Les informations ainsi obtenues par les deux approches sont complémentaires.

Dans le cadre de cette étude, les structures de communautés obtenues avec les deux approches sont suffisamment robustes et cohérentes pour permettre de réaliser des évaluations d'état écologique.

4) Richesses taxonomique et génétique

a) Richesse taxonomique : comparaison moléculaire et morphologie 2020

Sur les 14 stations suivies via l'approche morphologique en 2020, 69 taxons diatomées ont été identifiés lors de la campagne 2020 avec en moyenne 17 taxons par station (*Table 1*). Les 5 espèces dominantes, représentant plus de 76,4% des valves observées, correspondent à *Achnantheidium minutissimum var. minutissimum*, *Cocconeis euglypta*, *Achnantheidium lineare*, *Achnantheidium pyrenaicum* et *Achnantheidium rostrropyrenaicum*.

Sur les 39 stations suivies via l'approche moléculaire en 2020 et 2021, 108 taxons ont été identifiés correspondant à une moyenne de 30 (2020) et 33 (2021) taxons par station (*Table 1*). Les 5 espèces dominantes sur les deux années cumulées sont *Achnantheidium minutissimum*, *Gomphonema pumilum var. pumilum*, *Achnantheidium pyrenaicum*, *Gomphonema unclassified* et *Cymbella_excisa*, représentant à elles seules plus de 50% des séquences ADN obtenues.

Les richesses taxonomiques moléculaires observées sur les stations sont supérieures à celles obtenues en microscopie pour l'année 2020, avec en moyenne 30 taxons contre 17.

Sur les 5 BVs, les 2 stations localisées sur le Vallon de Cante ont les plus faibles richesses observées, ce pour avec les 2 approches et pour les 2 années étudiées.

³ Vasselon et al. 2019, Assessing pollution of aquatic environments with diatoms' DNA metabarcoding: experience and developments from France water framework directive networks. *Metabarcoding and Metagenomics*

Code_Projet	Code_station	Richesse_taxonomique (nb. de taxa à l'espèce)			Richesse_genetique (nb. de variants ADN)	
		Morpho 2020	ADN 2020	ADN 2021	ADN 2020	ADN 2021
RS045	ESTE01	21	32	-	51	-
RS046	ESTE03	21	36	39	66	63
RS047	ESTE04	-	28	34	44	62
RS048	ESTE04bis	12	31	30	50	45
RS049	ESTE05	-	32	39	53	53
RS050	ESTE06	23	43	42	60	59
RS051	ESTE07	-	32	28	47	40
RS052	ESTE08	22	42	37	60	48
RS053	AMEN00	21	35	40	64	68
RS054	AMEN01	16	28	30	51	48
RS055	CANT00	8	9	20	24	34
RS056	CANT01	11	16	28	31	48
RS057	CIAN01	21	31	38	42	58
RS058	CIAN04	-	30	38	44	49
RS059	CIAN05	14	33	35	41	46
RS060	CIAN08	-	29	29	44	39
RS061	CIAN09	13	37	36	55	47
RS062	ROUD00	11	26	24	37	34
RS063	ROUD01	-	17	28	28	43
RS064	ROUD02	18	32	35	49	53
	Moyenne	17	30	33	47	49
	Dev. Std.	9	8	9	11	14

Table 1 – Richesses taxonomique (nb. de taxon) et génétique (nb. de variant) diatomée observées sur les stations avec les approches morphologique (morpho) et moléculaire (ADN) en 2020 et 2021.

Habituellement les stations localisées en tête de BV possèdent des richesses taxonomiques plus faibles que celles observées sur les autres stations en aval. Au fil du linéaire, les conditions environnementales changent devenant favorables à un plus grand nombre d'espèces. De plus, l'augmentation des pressions d'origines anthropiques (urbanisation, agriculture, élevage...) tend à faire augmenter les teneurs en nutriments et matières organiques dans l'eau, offrant plus de ressources. Ce profil amont/aval en termes de richesse n'est pas clairement visibles sur les 5 BVs qui ont des richesses assez stables entre stations, avec des variations plus ou moins importante à l'échelle de chaque station.

b) Richesse génétique : données ADN 2020

La richesse génétique observée est présentée comme le nombre de séquence ADN unique, ou variant génétique, retrouvé sur chaque station via l'approche moléculaire (Table 1). Au total, 325 variants génétiques ont été observés à l'échelle des BVs. La richesse génétique est en moyenne de 47 variants par station en 2020, cette dernière étant supérieure aux richesses taxonomiques morphologique (17) et moléculaire (30) obtenues en 2020.

La richesse génétique est très fortement et significativement corrélée à la richesse taxonomique moléculaire, ce pour les deux années d'étude (Fig. 9). Cette corrélation renseigne sur le fait qu'il existe plusieurs variants génétiques pouvant appartenir à la même

espèce (diversité cryptique), donnant un nouveau grain d'information pour caractériser les communautés de diatomées.

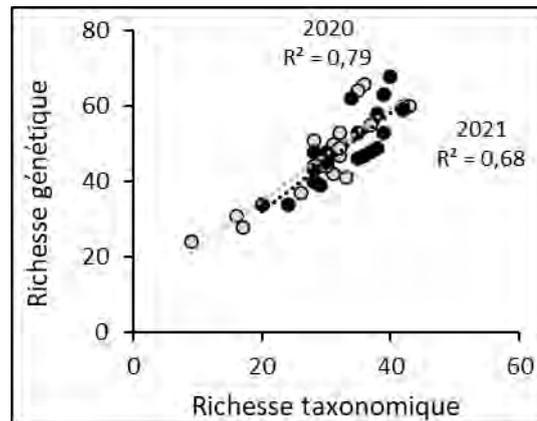


Fig. 9 – Corrélation entre richesse taxonomique moléculaire et richesse génétique obtenues sur l'ensemble des stations du BV en 2020 (gris) et 2021 (noir).

c) Variations interannuelles : données ADN 2020 et 2021

Les conditions météo observées lors des campagnes estivales de terrain étaient très contrastées entre 2020 (chaud et sec) et 2021 (plus frais et humide). Les communautés de diatomées étant sensibles à ces changements de conditions, il est normal de voir évoluer les richesses moléculaires taxonomiques et génétiques d'une saison à l'autre pour une même station. À l'échelle des BVs, les richesses taxonomiques moléculaire et génétique moyennes sont restées assez stables entre 2020 et 2021 avec respectivement 30 et 33 taxons ainsi que 47 et 49 variants détectés (Table 1).

À l'échelle de chaque station, les richesses observées sont restées assez stables sur certaines stations (e.g. RS050, RS054, RS062), tandis que des écarts importants ont pu être observés d'une année à l'autre sur d'autres (e.g. RS047, RS063), notamment sur le BV du Vallon de Cante (RS055, RS056). Les 5 BVs sont caractérisés par des cours d'eau vifs dont les régimes hydrologiques sont fortement influencés par les conditions météo et les conditions locales (zone de gorge...). Il est donc normal de voir fluctuer les communautés de diatomées d'une station à une autre et d'une année à l'autre.

d) Comparaison avec les BVs Rivières Sauvages

Avec une moyenne de 30 et 33 taxons observés par station en 2020 et 2021 sur les 5 BV avec l'approche moléculaire, la richesse taxonomique est similaire à la moyenne observée sur l'ensemble des BVs « Rivières Sauvages » étudiés qui est de 31 et 32 taxons par station (Table 2).direction

La richesse génétique observée sur le BV est en moyenne de 47 et 49 variants en 2020 et 2021 sur les 5 BVs, ce qui est légèrement inférieur à la moyenne observée à l'échelle des BVs RS qui est de 52 et 51.

BVs_Rivieres Sauvages	Richesse_taxonomique (nb. de taxa à l'espèce)		Richesse_genetique (nb. de variants ADN)	
	ADN 2020	ADN 2021	ADN 2020	ADN 2021
Beaume_Drobie	-	43	-	68
Cheran_Nephaz	28	26	44	42
Cians	32	35	45	48
Clu d'amen	32	35	58	58
Dorches	22	24	48	46
Esteron	35	36	54	53
Galeizon	30	32	40	43
Gioune	39	36	61	57
Groin et arvière	29	28	56	52
Guiers_mort	31	29	51	47
Leguer_Guic	46	43	65	59
Nant Benin	22	25	37	39
Pernaz	30	26	64	47
Pic	29	27	48	49
Reverotte	32	35	52	57
Rif_garçin	25	23	42	36
Roudoule	25	29	38	43
Semine	40	35	61	56
Taravo	34	32	47	42
Vallon de Cante	13	24	28	41
Valserine	34	32	55	51
Vézéronce	45	42	106	85
Moyenne	31	32	52	51
Dev. Std.	10	6	19	11

Table 2 – Richesses taxonomique et génétique obtenues sur les différents BVs Rivières Sauvages.

e) Comparaison avec les données métabarcoding ADN historiques

Les données acquises lors de cette étude ont pu être connectées et comparées aux données métabarcoding ADN diatomées historiques existant à l'échelle du territoire Français obtenues sur 1003 stations. De grandes amplitudes de richesses sont observées à l'échelle du territoire, les richesses taxonomiques et moléculaires étant en moyenne de 41 taxons et de 67 variants génétiques par stations (Fig. 10).

En comparaison les données obtenues sur 5 les BVs sont inférieures aux moyennes nationales. On visualise bien dans la Figure 10 l'amplitude des richesses observées à l'échelle du BV en lien avec les différences entre stations.

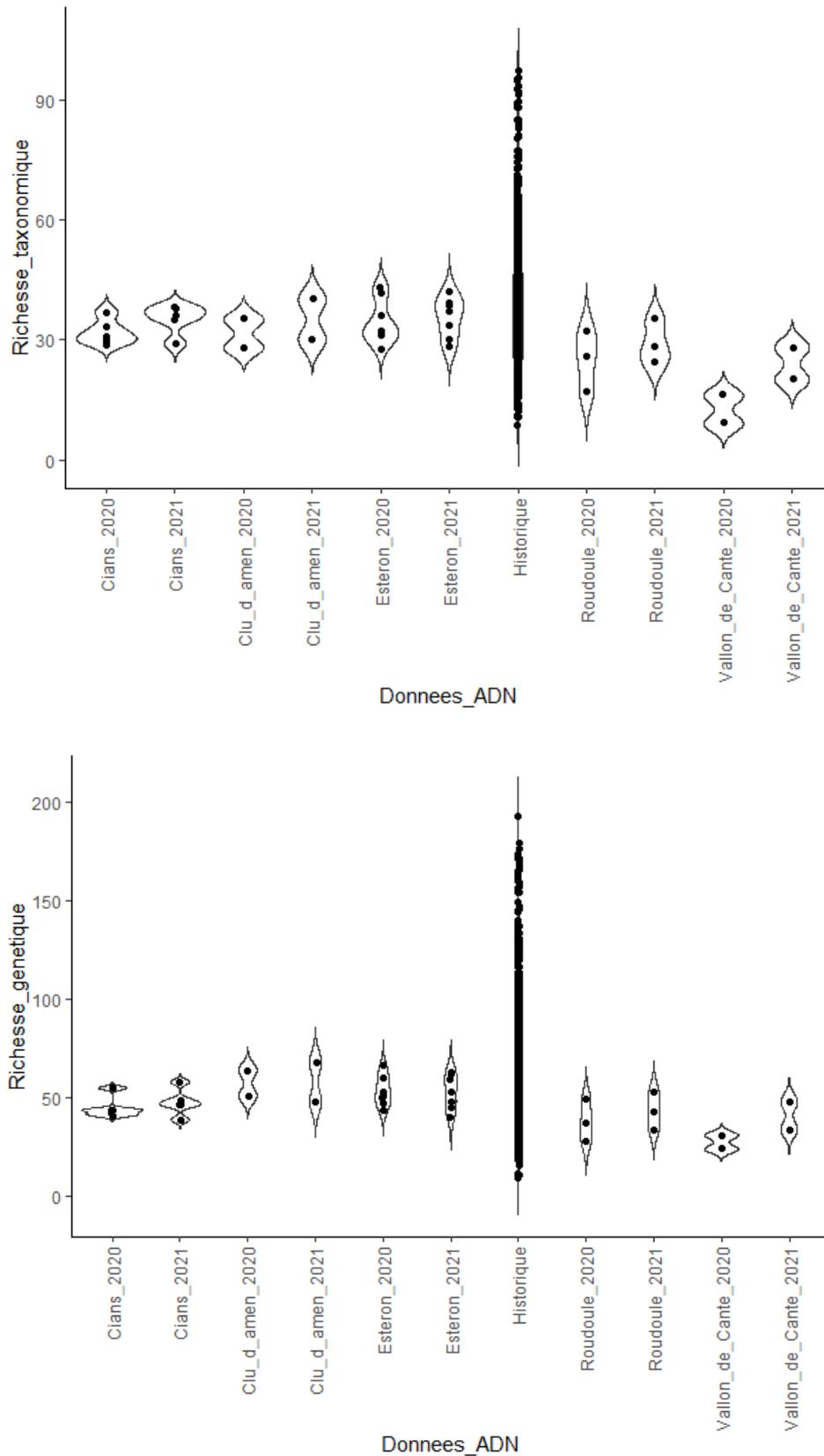


Fig. 10 – Richesses taxonomique (haut) et génétique (bas) obtenues sur les 20 stations des 5 BVs (2020 et 2021) en rapport avec la donnée metabarcoding ADN diatomées historique (n=1003 stations).

4) Inventaire de diversité

a) Inventaires taxonomiques moléculaires

Les inventaires de diversité taxonomique diatomées réalisés avec l'approche moléculaire lors des campagnes de terrain 2020 et 2021 sont présentés dans la *Figure 11*.

A l'échelle de chaque BV, les inventaires taxonomiques obtenus présentent des assemblages taxonomiques diatomées assez différents d'une station à l'autre, ce pour les 2 années. Les taxons détectés sont globalement similaires, mais leurs proportions changent créant des dominances différentes d'une station à l'autre. Comme déjà observé pour la richesse, ces changements d'inventaires sont liés au choix des stations qui se trouvent dans des contextes variés : différents cours d'eau échantillonnés (e.g. Vallon de Cante), des changements de contexte entre les stations en amont et en aval (zone de gorge, couverture du sol, influence de tributaire...) qui affectent différents paramètres (température, oxygène, luminosité, nutriments...) auxquels réagissent rapidement les diatomées. A cela s'ajoute les conditions météo locales qui peuvent aussi influencer sur les structures de communautés.

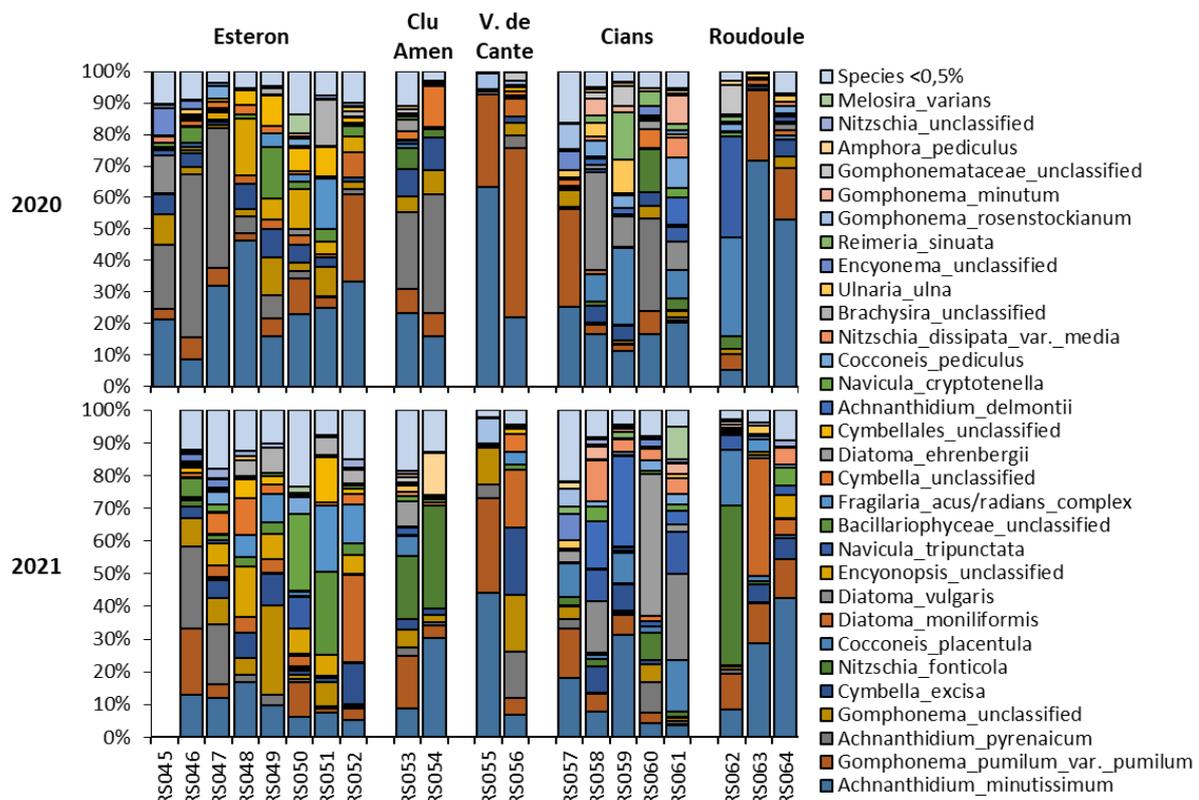


Fig. 11 – Inventaires taxonomiques de diatomées obtenus en métabarcoding sur les 20 stations des 5 BVs en 2020 (haut) et 2021 (bas). Exprimé en % de séquences ADN, seuls les taxons >0.5% sont détaillés.

b) Variabilité interannuelle

A l'échelle des 20 stations, les 5 taxons moléculaires dominants observés l'année 2020 correspondent à *Achnantheidium minutissimum* (27,4%), *Gomphonema pumilum* var.

pumilum (12,7%), *Achnantheidium pyrenaicum* (11,6%), *Cymbella excisa* (4%) et *Cocconeis placentula* (3,9%). Pour l'année 2021, les mêmes espèces dominantes sont observées *Achnantheidium minutissimum* (16,1%), *Gomphonema pumilum var. pumilum* (8,4%), *Nitzschia fonticola* (6,3%), *Gomphonema unclassified* (5,6%) et *Diatoma moniliformis* (5,4%) (Fig.11).

Dans l'ensemble les espèces très dominantes détectées restent similaires d'une année à l'autre sur l'ensemble des stations des 5 BV. Les différences d'assemblage observées à l'échelle de chaque station sont principalement liées à des changements dans les abondances relatives des taxons, ce qui change les dominances dans les inventaires. C'est par exemple le cas pour la station RS063 sur la Roudoule (ROUD01) dominée par *Achnantheidium minutissimum* en 2020 (71,8%) et par *Diatoma moniliformis* en 2021 (36%) ou encore la station RS056 sur le Vallon de Cante (CANT01) dominée par *Gomphonema pumilum var. pumilum* en 2020 (53,4%) et par *Cymbella excisa* en 2021 (20,1%). Ces écarts sont notamment dus aux différences dans les conditions hydrologiques entre les 2 années ainsi que dans des changements locaux (température d'eau, débit, oxygène, nutriments, pH...).

c) Variabilité interannuelle : guildes écologiques

Chaque taxon diatomées possède des préférences écologiques qui lui sont propres. A partir des inventaires taxonomiques moléculaires, il est possible de regrouper ensemble les taxons en fonction de leurs préférences écologiques sous forme de guildes (Passy et al. 2007⁴). Ces guildes traduisent des préférences face à des gradients de nutriments et de perturbations du cours d'eau (débit, profondeur) : « low profile » guildes retrouvées dans les habitats pauvres en nutriments et à forte perturbation ; « high profile » guildes principalement retrouvées dans les sites riches en nutriments et dans des conditions de faible débit d'eau ; « motile » augmente le long des gradients de nutriments et diminue le long du gradient de perturbation ; « planctonique » regroupe ensemble les taxons diatomées qui se développent dans la colonne d'eau qui sont donc peu rencontrés dans les échantillons de biofilms (diatomées benthiques) ; « variable » regroupe les taxons diatomées ne rentrant pas dans les autres catégories car n'ayant pas de préférences écologiques clairement identifiées.

Les proportions moyennes de guildes écologiques retrouvées sur les stations des 5 BV en 2020 et 2021 sont présentées dans la *Figure 12*.

Sur l'ensemble des BVs, une majorité de taxons diatomées associés à la guildes « Low profile » a été retrouvée, ce aussi bien en 2020 (50%) qu'en 2021 (33,5%). Ce résultat est logique puisque les BVs de l'Estéron, du Clu d'Amen, du Vallon de Cante, du Cians et de la Roudoule sont caractérisés par des cours d'eau de tête de BV vifs et très oxygénés avec naturellement peu de nutriments. Ces cours d'eau étant dans la majorité localisés dans des vallées avec des zones de gorge, il y a assez peu de secteurs d'élevages et d'agricultures pouvant amener des nutriments, ce qui favorise les taxons « Low profile » et limite le développement des taxons « High profile ».

⁴ Passy, S. I. (2007). Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquatic Botany*, 86(2), 171–178. doi:10.1016/j.aquabot.2006.09.018

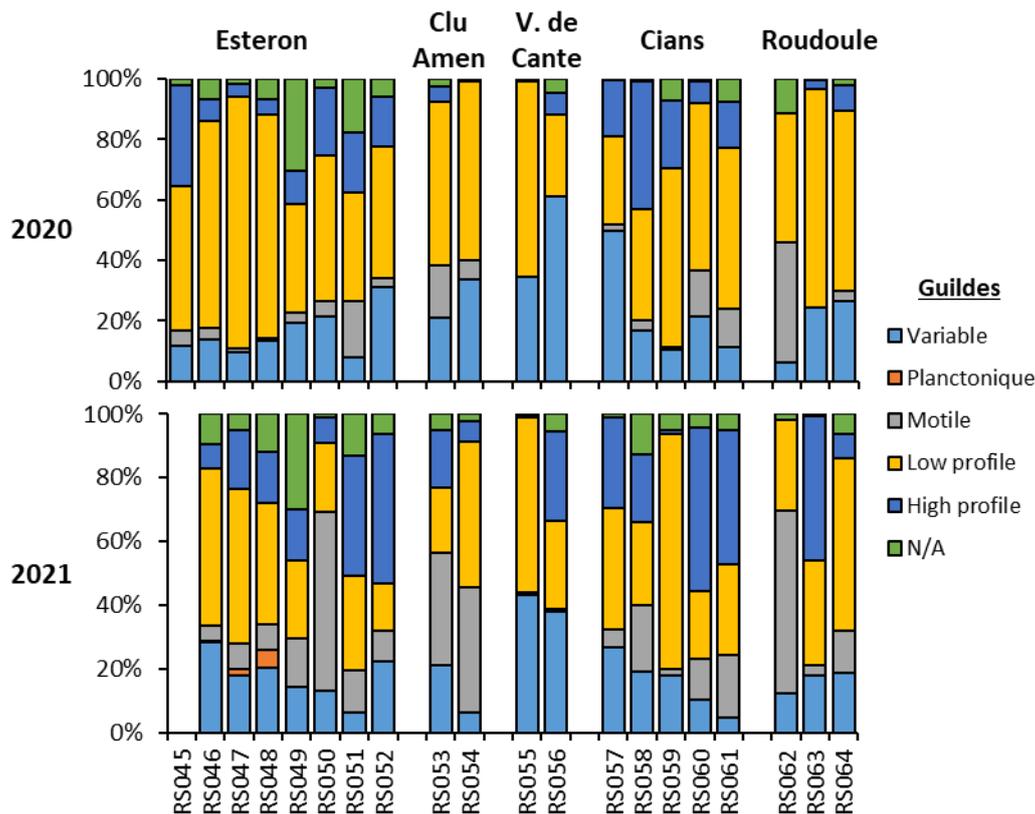


Fig. 12 – Guildes écologiques de diatomées (%) obtenues à partir des inventaires taxonomiques moléculaires à l'échelle des 5 BVs en 2020 (haut) et 2021 (bas). La catégorie N/A intègre tous les taxons diatomées n'ayant pas pu être associés aux 5 guildes.

En 2021, on observe une diminution progressive des taxons « Low profile » au profit de taxons « High profile » et « Motile » de l'amont vers l'aval des BVs, particulièrement visible sur l'Estéron et le Cians pour lesquels plus de stations ont été positionnées sur le long du linéaire. Au fil du cours d'eau, les teneurs en nutriments augmentent et le profil du cours d'eau évolue naturellement de zone de radier (débit important, eau oxygénée) à des zones plus calmes qui favorisent différentes espèces de diatomées et explique ces transitions de classes écologiques.

Les variabilités interannuelles en termes de pression locales et conditions météo expliquent certainement les écarts observés entre 2020 et 2021.

5) Etat écologique

a) Considérations méthodologiques

A partir des inventaires taxonomiques diatomées, il est possible d'évaluer l'état écologique des cours d'eau via le calcul d'indices. L'Indice Biologique Diatomées (IBD) est l'indice de référence utilisé pour réaliser les suivis réglementaires des cours d'eau en France métropolitaine dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE).

La méthode est normalisée et le calcul des indices repose sur des inventaires de diatomées obtenues avec l'approche morphologique. Bien que l'approche moléculaire permette

d'obtenir des inventaires taxonomiques et de calculer des notes IBD, les notes obtenues par ce biais ne sont pas reconnues réglementairement et ne peuvent donc pas être utilisées pour des suivis DCE.

Dans le cadre de ce travail, les notes IBD moléculaires produites servent comme outils de bioindication indépendants de suivis DCE et leur interprétation scientifique est dédiée au contexte de cette étude.

b) Indice Biologique Diatomée (IBD)

Les notes IBD vont de 1 à 20, correspondant à des classes d'état écologique allant de « très mauvais » <5, « mauvais »]5 à 9], « moyen »]9 à 13], « bon »]13 à 17] à « très bon état »]17 à 20]. Les valeurs seuils délimitant les classes d'état ont été choisies pour pouvoir être appliquées de manière globale à l'ensemble des données obtenues dans cette étude. Les notes IBD obtenues pour les stations du BV sont présentées dans la *Table 3*.

A l'échelle des 5 BVs, l'ensemble des stations renseignent un « bon » ou un « très bon » état écologique avec les différentes méthodes déployées (microscopie, ADN) et pour les deux années d'étude (2020, 2021). Les stations étant en tête de bassin versant, ces résultats étaient attendus et confirment que les communautés de diatomées renseignent bien sur l'état écologique du milieu.

Code_Projet	Code_station	IBD_Morpho 2020	IBD_ADN 2020	IBD_ADN 2021
RS045	ESTE01	20	20	-
RS046	ESTE03	20	20	20
RS047	ESTE04	-	20	20
RS048	ESTE04bis	20	20	19,7
RS049	ESTE05	-	20	20
RS050	ESTE06	20	19,7	15,3
RS051	ESTE07	-	20	20
RS052	ESTE08	20	20	20
RS053	AMEN00	20	20	18,3
RS054	AMEN01	20	20	17,5
RS055	CANT00	20	20	20
RS056	CANT01	20	20	20
RS057	CIAN01	20	20	20
RS058	CIAN04	-	17,1	16,8
RS059	CIAN05	15,7	16,2	18,8
RS060	CIAN08	-	20	20
RS061	CIAN09	16,4	16,7	15,9
RS062	ROUD00	14,6	16,2	16,3
RS063	ROUD01	-	20	20
RS064	ROUD02	20	19,6	19,3

Table 3 – Notes IBD obtenues à partir des inventaires taxonomiques morphologique (2020) et moléculaires (2020, 2021) pour les 20 stations des 5 BVs. Les couleurs correspondent aux classes d'état : très mauvais (rouge), mauvais (orange), moyen (jaune), bon (vert), très bon (bleu).

Sur le BV du Cians, les notes IBD obtenues sur la Station RS059 (CIAN05) sont assez basses en 2020. Cette station étant localisée le plus aval du BV proche de la confluence

avec le Var, elle concentre à la fois les pressions du BV (élevage, agriculture, zones d'habitations) et est potentiellement sou influence du Var, ce qui explique que les notes soient plus basses. Pour ce qui est de la station RS061 (CIAN09) localisée en milieu de BV, les notes IBD sont plus basses sur les 2 années avec les 2 approches. Cette station est localisée en sortie de gorge dans laquelle des conditions locales particulières peuvent avoir affecter les conditions du milieu (faible luminosité, géologie, zones d'eau plus stagnantes, accumulation de matière organique...). De plus cette station est aussi sous l'influence d'affluent (Vallon de Perlas), d'habitations et d'activités touristiques qui peuvent apporter des nutriments et de la matière organique au cours d'eau. Même si ces pressions sont minimales, elles peuvent suffire à influencer les communautés de diatomées et expliquer les notes IBDs obtenues.

Sur le BV de la Roudoule, la station RS062 (ROUD00) est en « bon » état écologique avec des notes plus basses que le reste du BV, ce avec les 2 approches et pour les 2 années étudiées. Cette station localisée en amont du BV est sous influences de plusieurs habitations avec certainement des zones d'élevage et de culture qui apportent des nutriments et de la matière organique au milieu. Même si cet apport est minime, loin d'être considéré comme une pollution, le cours d'eau étant assez petit cela suffit pour affecter les communautés de diatomées et les notes IBD.

Si des effets liés à des pressions sont détectables, ils restent acceptables sur l'état écologique des cours d'eau qui sont en « bon » et « très » bon états écologiques (IBD morpho). Si les pratiques d'élevages et le tourisme tendent à se développer sur les BVs étudiés, il serait pertinent de continuer ces suivis pour évaluer l'évolution de l'état écologique du cours d'eau.

c) Indice de Polluosensibilité Spécifique (IPS)

Tout comme l'IBD, l'IPS est calculé à partir d'un inventaire taxonomique diatomées en utilisant les informations de sensibilité de chaque taxon diatomées vis-à-vis de pollution (notamment matières organiques, nutriments). Par rapport à l'IBD, l'IPS prend en compte plus de taxons diatomées dans son calcul le rendant globalement plus sensible que l'IBD qui peut dans certaines situations surévaluer la qualité des cours d'eau. Si l'IBD est l'indice utilisée en routine pour les suivis DCE en France métropolitaine, l'IPS quant à lui est généralement utilisé pour les exercices d'intercalibration et d'intercomparaison en Europe. Les notes IPS obtenues pour les stations du BV sont présentées dans la *Table 4*.

Comme attendu les notes IPS sont plus basses que les notes IBD pour l'ensemble des stations. Les notes obtenues avec les 2 approches indiquent des classes en « bon » et « très bon » état écologique.

Les écarts entre notes IBD et IPS sont dû à la présence de taxons diatomées identifiés seulement aux genres (e.g. *Gomphonella*, *Fragilaria*, *Nitzschia*) dans les inventaires moléculaires. Ces genres sont connus pour regrouper en majorité des espèces indicatrices de milieux en bon et moyen état dans le calcul de l'IPS. Cependant l'IBD ne prend pas en compte les genres dans son calcul mais seulement les taxons identifiés à l'espèce, ce qui explique les écarts de notes entre les 2 indices.

Les mêmes tendances que pour l'IPS sont observées que pour l'IBD, cependant les notes IPS 2021 sont d'en l'ensemble plus basses qu'en 2021. Ceci est certainement du à la variabilité saisonnière interannuelle avec des conditions climatiques différentes.

Code_Projet	Code_station	IPS_Morpho 2020	IPS_ADN 2020	IPS_ADN 2021
RS045	ESTE01	18,9	17,4	-
RS046	ESTE03	19,3	18,3	17,7
RS047	ESTE04	-	19	17
RS048	ESTE04bis	18,7	18,5	17,1
RS049	ESTE05	-	17,5	16,9
RS050	ESTE06	17,3	17,2	13
RS051	ESTE07	-	17,5	16,7
RS052	ESTE08	18,8	17,6	15,5
RS053	AMEN00	18,7	17,4	14,8
RS054	AMEN01	18,9	18,1	16,8
RS055	CANT00	19,8	19,2	18,6
RS056	CANT01	17,7	17,8	16,6
RS057	CIAN01	19,2	17,6	17,4
RS058	CIAN04	-	16	15,3
RS059	CIAN05	15,1	15,9	16,7
RS060	CIAN08	-	17,6	15,9
RS061	CIAN09	15,6	16,3	15,5
RS062	ROUD00	14	16,4	14,8
RS063	ROUD01	-	19,1	15,9
RS064	ROUD02	18,4	17,5	16,4

Table 4 – Notes IPS obtenues à partir des inventaires taxonomiques morphologique (2020) et moléculaire (2020, 2021) pour les 20 stations des 5 BVs. Les couleurs correspondent aux classes d'état : très mauvais (rouge), mauvais (orange), moyen (jaune), bon (vert), très bon (bleu).

La station RS050 est classée en « moyen » état mais se trouve juste à la limite du « bon » état. Ce déclassement est dû à une légère augmentation de plusieurs taxons indicateurs d'état moyen (e.g. *Nitzschia*, *Fragilaria*). Cet écart de note entre 2020 et 2021 vient de l'accumulation de pressions locales (habitation) et environnementale qui ont pu déclasser la note.

6) Structure des communautés de diatomées

a) A l'échelle du BV

A partir des inventaires moléculaires obtenus, il est possible de comparer la structure des communautés de diatomées entre les stations. Pour cela l'indice de Bray-Curtis est utilisé, il permet de calculer un pourcentage de dissimilarité entre 2 communautés en fonction des différences de taxons présents et de leurs abondances. Cet indice permet d'évaluer à quel point les stations sont différentes entre elles et l'information peut être visualisée graphiquement via une NMDS (Non-metric multidimensional scaling, Fig. 13).

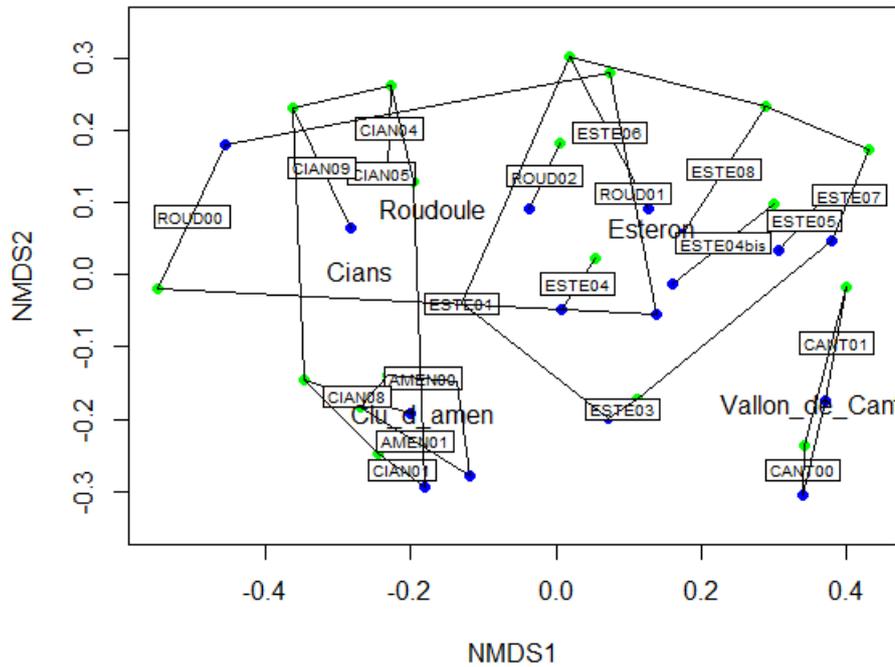


Fig. 13 – Comparaison des structures de communautés diatomées obtenues en 2020 (point bleu) et 2021 (point vert) à l'échelle des 20 stations des 5 BVs. Plus les points sont éloignés graphiquement sur la NMDS et plus les assemblages de diatomées sont différents.

Les premiers éléments obtenus montrent que les structures de communautés de diatomées sont suffisamment différentes pour discriminer les stations des 5 BVs entre elles, notamment sur le Clu d'Amen et le Vallon de Cante. Les variations interannuelles observées précédemment dans les inventaires taxonomiques diatomées sont visibles sur la NMDS, les stations 2020 (bleu) et 2021 (vert) étant assez éloignées.

Les stations RS062 (ROUD00), RS061 (CIAN09), RS059 (CIAN05) et RS058 (CIAN04) ont des structures de communautés similaires, elles se sont regroupées ensemble sur la NMDS bien qu'elles proviennent de BVs différents. Ces stations sont celles avec les notes d'état écologiques les plus basses, les pressions locales affectant ces stations doivent être similaires expliquant leur rapprochement (habitation, culture, élevage).

Les stations localisées sur le Vallon de Cante sont les plus éloignées sur la NMDS car leur structure de communauté diffère significativement de celles des autres BVs. Comme décrit précédemment, les stations RS055 (CANT00) et RS056 (CANT01) ont les plus faibles richesses diatomées et sont principalement composée d'une ou deux espèces dominantes, contrairement aux autres stations ayant une richesse plus élevée avec un plus grand nombre d'espèces dominantes.

A l'échelle du BV de l'Estéron, les stations semblent s'organiser selon l'axe longitudinal du cours d'eau le long de l'axe NMDS1, les stations amont étant à gauche (EST01, EST03, ESTE04) et les stations aval à droite (EST05, EST07, ESTE08).

Le nombre de stations et de répliques étant peu nombreux à l'échelle des 5 BVs, la robustesse des interprétations statistiques reste limitée. L'acquisition de nouvelles données serait nécessaire pour évaluer précisément le poids de chaque paramètre dans la structuration des communautés de diatomées.

b) A l'échelle du réseau RS

Une grande diversité d'assemblage de diatomées a été observée à l'échelle de l'ensemble des stations Rivières Sauvages étudiées avec 257 taxons détectés via l'approche moléculaire (2020 et 2021 cumulées). Les stations des BVs de l'Estéron, du Clu d'Amen, du Vallon de Cante, du Cians et de la Roudoule ont des communautés proches d'autres BVs RS comme le Chéran ou encore la Valserine (Fig. 14).

Une grande partie des BVs RS étudiés sont localisés dans le bassin RMC et ont donc plus de similitudes en termes de typologies de cours d'eau, de conditions géologiques et climatiques. Cela explique en partie le fait que de nombreux BVs RS soient fortement regroupés ensemble, leurs communautés de diatomées étant structurées par ces facteurs.

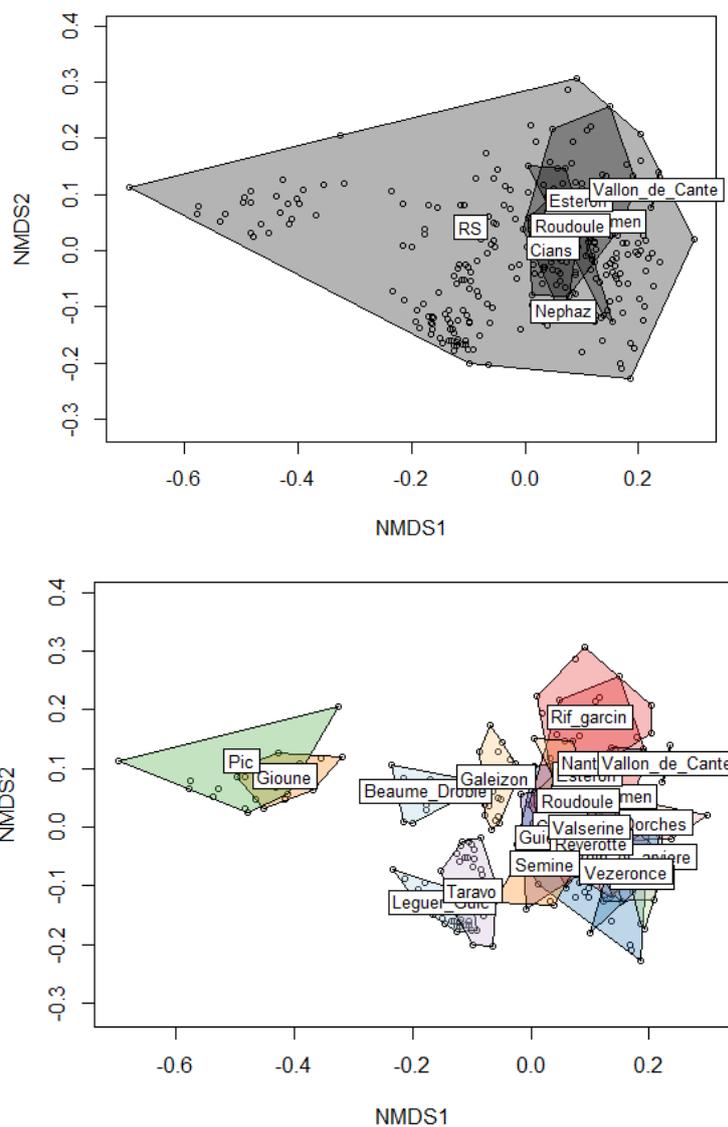


Fig. 14 – Comparaison des structures de communautés diatomées obtenues sur les 5 BVs à l'ensemble des stations Rivières Sauvages (RS) en 2020 et 2021 (haut, n=325). La distribution des stations pour chaque BV du réseau RS est mise en avant (bas).

7) Confrontation aux données historiques et particularités locales

a) Comparaison à la base de données génétique « Diat.barcode »

Lors de la réalisation des inventaires taxonomiques moléculaires diatomées, une taxonomie est attribuée aux séquences ADN environnementales en comparant ces dernières aux données de références de la base « Diat.barcode »⁵. La qualité des inventaires taxonomiques moléculaire dépend donc de la qualité des informations contenues dans la base (séquences ADN de référence, taxonomie associée...), mais aussi de son niveau de complétion.

La dernière version de la base (v10.1) contient 4784 séquences ADN *rbcl* de références utilisables pour dresser des inventaires moléculaires diatomées. Si ces informations sont suffisantes pour identifier la majorité des espèces dominantes retrouvées dans les cours d'eau de France métropolitaine, une grande partie des espèces peu abondantes ou très rares sont non référencées et donc non identifiables dans les inventaires ADN environnementaux.

A partir des inventaires taxonomiques morphologiques obtenus en 2020 sur les 14 stations des 5 BVs, 33 taxons de diatomées ont pu être identifiés comme absents ou peu représentés dans la base « Diat.barcode », dont 12 suffisamment abondants et distribués à l'échelle des BVs pour pouvoir être exploités (Table 5).

Morpho_Name	%_max_observe	Station
<i>Cocconeis_euglypta</i>	85,22	ROUD00
<i>Achnanthydium_rostropyrenaicum</i>	47,57	ESTE03
<i>Gomphonema_lateripunctatum</i>	3,09	CANT01
<i>Gomphonema_pumilum</i>	3,36	ROUD02
<i>Brachysira_neglectissima</i>	7,1	ESTE08
<i>Gomphonema_angustivalva</i>	7,84	CANT01
<i>Cocconeis_pseudolineata</i>	3,2	ROUD00
<i>Cymbella_parva</i>	4,02	AMEN00
<i>Fragilaria_delicatissima</i>	3,16	ESTE06
<i>Cymbopleura_amphicephala</i>	2,99	ESTE01
<i>Sellaphora_ventraloides</i>	2,91	ESTE03
<i>Fragilaria_austriaca</i>	2,47	CANT01

Table 5 – Taxons diatomées retrouvés dans les inventaires morphologiques (2020) sur les 5 BVs et absents de la base de référence génétique « Diat.barcode ». Les taxons sont présentés en % d'individus et la station dans laquelle ils sont les plus abondants renseignée.

Cette quantité de taxons diatomées non référencés est très importante. Ces résultats seront communiqués à INRAE afin de compléter la base de référence « Diat.barcode » : soit en partant des données déjà acquises durant cette étude, soit en ciblant spécifiquement les stations identifiées pour réaliser de nouveaux prélèvements de biofilm et tenter d'isoler les espèces en laboratoire.

⁵ <https://www6.inrae.fr/carrel-collection/Barcoding-database>

b) Taxons diatomées spécifiques au 5 BVs

Les inventaires taxonomiques moléculaires obtenus dans le cadre de cette étude ont été comparés à ceux obtenus lors de différents programmes de recherche réalisés sur un grand panel de cours d'eau en France métropolitaine (notamment les actions OFB-INRAE 2016–2018⁶). Le jeu de données ainsi obtenu comporte 1003 stations et bien que ce dernier reste limité à l'échelle de l'ensemble des cours d'eau du territoire, il a pour objectif de mettre en avant certains taxons détectés seulement sur les 5 BVs.

A l'issue de l'analyse, l'ensemble des taxons moléculaires détectés sur les 5 BVs ont déjà été observés sur d'autres stations du territoire. Ceci est principalement dû au fait qu'une partie des taxons moléculaires n'ont pas pu être identifiés à l'espèce du fait de l'incomplétude de la base de référence génétique. Les données historiques comprenant un grand nombre de stations localisées dans le bassin RMC les taxons présents dans ces dernières doivent être plutôt bien représentés dans le jeu de donnée complet, couvrant les taxons des 5 BVs. Toutefois, en comparant les résultats morphologiques obtenus en 2020 sur les 5 BVs aux autres BV RS, des taxons spécifiques à ces BVs sont présents comme *Achnanthydium rostrorynaicum* (RS045 ESTE01) ou encore *Diatoma moniliformis* (RS052 ESTE08).

La « Rote list ⁷ » correspond à la liste rouge pour les diatomées et permet d'évaluer leur niveau de rareté. Comme les diatomées sont des organismes microscopiques difficiles à étudier, les connaissances sur leurs aires de distribution géographique et leur niveau de rareté sont généralement limitées. De plus les approches morphologiques et moléculaires ayant chacune leur biais en termes de précision d'assignation taxonomique, certains taxons mal identifiés pourraient faire croire à la présence de taxons « très rare » alors qu'ils sont « non menacé ». De ce fait il faut interpréter avec prudence le classement des taxons diatomées dans la « Rote list », les informations de cette dernière pouvant être incomplètes. Toutefois, l'approche morphologique a notamment permis de mettre en évidence une espèce non détectée via l'approche moléculaire listée comme « très menacée » : *Achnanthydium lineare*. Cette dernière, présente en forte abondance sur certaines stations des BVs de l'Estéron (RS048, RS052), du Vallon de Cante (RS055, RS056) et de la Roudoule (RS064) est référencée dans la base de référence génétique, mais n'est pas détectée avec l'approche moléculaire.

L'espèce *Didymosphenia geminata* a été détectée par les 2 approches sur plusieurs stations de l'Estéron (RS06, RS047, RS048, RS049, RS050, RS051) et une station du Cians (RS060, en très faible abondance). Cette espèce est connue pour se développer dans des rivières avec : un débit stable, une forte exposition à la lumière, des eaux claires et pauvres en éléments nutritifs. On peut donc la retrouver naturellement sur des stations en tête de BV et dans des cours de d'eau de montagne. A partir de l'analyse de l'ensemble des données nationales, cette espèce a aussi été détectée dans des cours d'eau dans les Alpes (Durance, Tillet) et les Pyrénées (Garonne, Gave de Pau, Gave d'Aussan). Cette espèce est aussi connue pour être une espèce invasive dans certains pays avec de fort enjeux de

⁶ Vasselon et al. (2019). Assessing pollution of aquatic environments with diatoms' DNA metabarcoding: experience and developments from France water framework directive networks. *Metabarcoding and Metagenomics*, 3. doi:10.3897/mbmg.3.39646

⁷ Rote Liste und Gesamtartenliste der limnischen Kieselalgen (Bacillariophyta) Deutschlands.- In: Metzger, D. & al. Band 7: Pflanzen. Bonn – Naturschutz und Biologische Vielfalt 70 (7): 601–708

gestion dans la mesure où elle peut se développer de manière sur-exagérée sous forme de bloom. Ces blooms produisent des biofilms très épais qui peuvent colmater le fond des cours d'eau et affecter l'écologie des autres groupes biologiques. Dans le cas des BVs de l'Esteron et du Cians, cette espèce semble être présente naturellement avec peu de probabilité de faire des blooms. Toutefois la présence de cette espèce nécessiterait une attention particulière pour évaluer ses probabilités de faire des blooms au vu des conditions du milieu (Ratio N/P, nutriments, Température de l'eau), mais aussi pour évaluer les risques de propagation à d'autres milieux où elle pourrait être invasive. Cette information sera notamment discutée avec l'OFB.

c) Variants génétiques (*rbcl*) diatomées spécifiques aux 5 BVs

De la même manière que pour les inventaires taxonomiques moléculaires, les données génétiques obtenues pour chaque station du BV ont été comparées aux données historiques à l'échelle du territoire. De cette manière il est possible d'évaluer si certaines séquences ADN obtenues correspondent à des variants génétiques spécifiques au BV.

A l'issue de l'analyse, 38 variants spécifiques aux 5 BVs ont été détectés dont 5 en abondances suffisantes et retrouvés sur les mêmes stations en 2020 et 2021 (*Table 6*).

Variant genetique	Sequence_ADN	Taxon_diatomee	Stations
seq398	CATTACTGCTGGTACAATGGAAGAAGTATACAAACGCTGCTGAGTATGCTAAAGCT GTTGGCTCTGTTATTATAATGATCGATTTAGTTATGGGTTACACAGCAATCCAAAG TTCTGCTATTTGGGCTCGTGAACGATATGATTTTACACTTACACCGTGCGGGTA ACTCAACTTACGCTCGTCAAAAAAATCATGGTATTAACCTCCGTGTTATCTGTAAA TGGATGCGTATGTGAGGTGTAGATCATATCCACGCTGGAA	Bacillariophyceae_unclassified	RS051
seq883	CATTACTGCAGCTACAATGGAAGAAGTGTACAAACGCTGCTGAGTACGCTAAAGC AGTTGGTTCTATCGTTGTAATGATCGATTTAGTTATGGGTTACACAGCAATCCAAA GTTACAGTATCTGGGCTCGTGAACGATATGCTTTTACATTTACACCGTGACAGGT AACTCAACTTATGCACGTCAAAAAAATCATGGTATTAACCTCCGTGTTATTTGTA ATGGATGCGTATGTCTGGTGTAGATCATATCCACGCTGGTA	Gomphonema_pumilum_var._pumilum	RS057
seq894	CATTACTGCAGCTACAATGGAAGAAGTGTACAAACGCTGCTGAGTACGCTAAAGC AGTAGGTTCTATCGTTGTAATGATCGATTTAGTTATGGGTTACACAGCAATCCAAA GTTACAGTATCTGGGCTCGTGAACGATATGCTTTTACATTTACACCGTGACAGGT AACTCAACTTATGCACGTCAAAAAAATCATGGTATTAACCTCCGTGTTATTTGTA ATGGATGCGTATGTCTGGTGTAGATCATATCCATGCTGGTA	Gomphonema_pumilum_var._pumilum	RS055
seq923	CATTACTGCTGGTACAATGGAAGAATGTACAAACGCTGCTGAGTATGCTAAAGCT GTTGGTTCAGTAATCGTAATGATTGATTTAGTATTAGGTTACACAGCAATCCAAAG TGCTGCACTATGGGCTCGTGAACGATGTTGTTTTACACTTACACCGTGACAGGTA ACTCTACATATGCTCGTCAAAAAAATCATGGTATCAACTCCGTGTTATTTGTA TGGATGCGTATGTCTGGTGTAGATCATATCCACGCTGGTA	Achnanthydium_unclassified	RS046
seq1087	CATTACTGCTGGTACAATGGAAGAAGTGTACAAACGCTGCTGAGTACGCTAAAGC TGTTGGTCTGTAATCGTAATGATCGATTTAGTTATGGGTTACACAGCAATCCAAA GTTCTGCTATCTGGGCTCGTGAATGACATGATCTTACACTTACACCGTGACAGGT AACTCAACTTACGCTCGTCAAAAAAATCACGGTATTAACCTCCGTGTTATTTGTA ATGGATGCGTATGTGAGGTGTAGATCATATCCATGCTGGTA	Gomphonema_rosenstockianum	RS055

Table 6 – Variants génétiques diatomées spécifiques aux 5 BVs retrouvés dans les inventaires moléculaires (2020, 2021) et absents de la base de référence génétique « Diat.barcode ». Les taxons sont présentés en % de séquence et la station dans laquelle ils sont les plus abondants renseignée.

Ces variants génétiques correspondent bien à une particularité locale. Par exemple, les variants seq883 et seq894 sont associées à la même espèce (*Gomphonema pumilum var. pumilum*), mais le variant seq883 n'est retrouvé que sur le BV du Cians et le seq894 sur le BV du Vallon de Cante. Des analyses complémentaires permettraient de valider leur origine

et de comprendre leur écologie qui peut être différente de celle décrite pour l'espèce et ainsi apporter de nouvelles informations sur l'état du milieu.

8) Conclusion et perspectives

L'utilisation de l'approche moléculaire pour inventorier les communautés de diatomées benthiques a pu être appliquée avec succès sur l'ensemble des cours d'eau Rivières sauvages participant à l'étude. Son utilisation à parmi de :

- Estimer la diversité et la richesse des diatomées
- Evaluer l'état écologique des stations
- Détecter des taxons et variants génétiques d'intérêt pour la conservation, certains ciblés comme espèces emblématiques
- Estimer les variations spatiales et temporelles affectant les communautés
- Contribuer à l'amélioration des connaissances génétiques sur les diatomées, notamment via la complétion des bases de références génétiques

Du fait de la présence de taxons atypiques en lien avec les particularités locales, il pourrait être intéressant de maintenir le suivi sur certaines stations pour compléter les connaissances déjà acquises et évaluer l'évolution temporelle des communautés de diatomées. Un travail couplé entre approches moléculaire et morphologique reste nécessaire pour caractériser correctement les taxons diatomées du cours d'eau qui sont peu communs.

Le suivi des taxons d'intérêt identifiées précédemment permettrait d'évaluer des changements du milieu associées à l'évolution des pressions locales et de réaliser des suivis de conservation. Ces suivis permettraient aussi d'évaluer l'effet de changements plus globaux notamment en lien avec le changement climatique.

9) Remerciements

Cette étude a été menée techniquement et scientifiquement par Scimabio-Interface. Sa réalisation n'aurait pu être possible sans :

- le soutien scientifique, technique et financier du SMIAGE pour le suivi des stations sur les BVs de l'Estéron, du Clu d'Amen, du Vallon de Cante, du Cians et de la Roudoule
- le soutien de l'association « Rivières Sauvages » pour la coordination des actions sur l'ensemble du réseau RS
- le partenariat scientifique apporté par le laboratoire INRAE CARTEL (Thonon)

Ce projet ayant été mené de manière collaborative entre tous les BVs, nous souhaitons remercier l'ensemble des personnes ayant contribué de prêt ou de loin à ce travail, pour leur implication et les échanges passionnés qui ont permis de travailler dans un très bel état d'esprit.

10) Contacts

Pour les informations techniques, vous pouvez contacter :

- Valentin VASSELON à valentin.vasselon@scimabio-interface.fr et au 07 88 04 51 64

La coordination du projet auprès des rivières labélisées « Rivières Sauvages » est assurée par :

- Mélanie TAQUET melanie.taquet@rivières-sauvages.fr sur le bassin Rhône, Méditerranée et Corse
- Denis CAUDRON denis.caudron@rivières-sauvages.fr sur le reste de la France