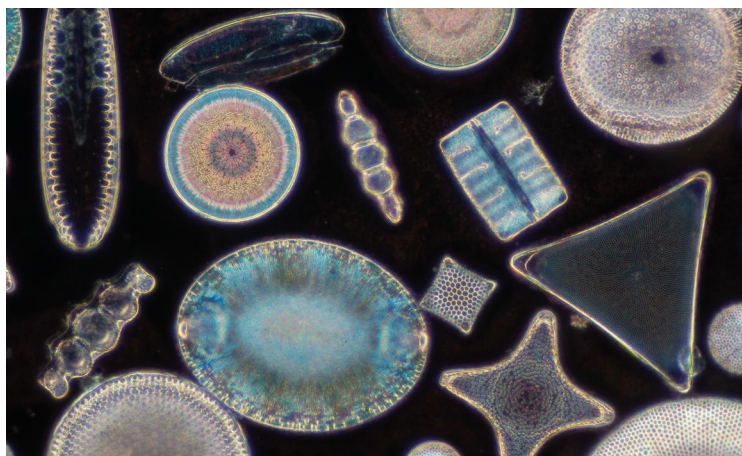


Le métabarcodage des diatomées : un outil pour optimiser l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques

MÉTHODOLOGIE Pour évaluer l'état écologique des rivières et des lacs, la directive-cadre sur l'eau (DCE) prévoit l'utilisation d'indicateurs biologiques (ou bio-indicateurs), tels que les diatomées, des microalgues utilisées depuis longtemps comme témoins de la qualité des eaux. Pour répondre à l'enjeu de densification de la surveillance environnementale, des études sont menées pour permettre d'inventorier les diatomées par séquençage à haut débit de leur ADN. Point sur les avancées de cette solution en devenir.

Les diatomées (voir Focus 1) benthiques sont utilisées, depuis plusieurs dizaines d'années, à travers le monde, pour l'évaluation biologique de l'état des eaux. La méthode repose sur l'attribution à chaque espèce, parmi les plus courantes dans le milieu pour une aire biogéographique donnée, d'un profil écologique qui reflète sa plus ou moins grande sensibilité selon le niveau de pollution. Les profils combinés des différentes espèces qui constituent la communauté présente dans un échantillon de biofilm prélevé, indiquent alors la qualité de l'eau. Par exemple, la méthode réglementaire qui prévaut en France continentale pour les cours d'eau, dans le cadre de la DCE, est l'Indice biologique diatomées (IBD). Il repose sur les profils écologiques de plus de 800 espèces de diatomées, qu'il faut être capable d'identifier au microscope : un travail qui nécessite du temps et une bonne expertise taxinomique.

→ Les diatomées, microalgues unicellulaires, peuplent tous les milieux aquatiques, des rivières aux océans.
© Adobe Stock, Natureeye91



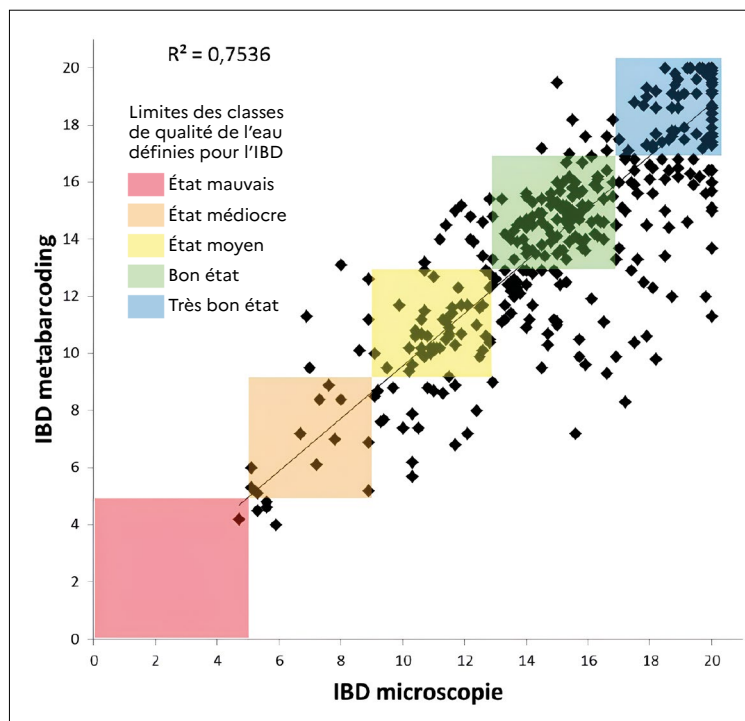
débit de l'ADN, ont laissé entrevoir le potentiel de ces méthodes pour réaliser les inventaires des espèces de diatomées, en lieu et place de la microscopie. En passant du *barcoding*, codage qui permet d'identifier un organisme comme appartenant à une espèce donnée à partir d'une séquence spécifique de son ADN, au métabarcodage, qui permet d'identifier différentes espèces à partir de leurs séquences respectives, il devenait envisageable de séquencer l'intégralité des espèces présentes dans des centaines d'échantillons en une seule opération. Le front de science ainsi ouvert a donné lieu à une abondante littérature scientifique, tant sur les nombreux aspects applicatifs de la méthode (écologie, biogéographie, bio-indication...) que sur les développements et la correction des biais méthodologiques.

Un besoin de standardisation et de convergence des indicateurs

Cependant, si le protocole de métabarcodage suit un schéma standard (voir Focus 2) et bien que les outils issus de la recherche soient accessibles à tout laboratoire de biologie moléculaire, la méthode n'est pas encore normalisée par l'Agence française de normalisation (Afnor) ; un prérequis, attendu par les gestionnaires, pour garantir la qualité des résultats d'évaluation. Parmi les autres verrous à lever : la crainte d'une rupture entre la chronique historique des données d'état écologique, dont certaines ont plusieurs dizaines d'années, et la nouvelle chronique qui résulterait de la bascule vers une approche purement moléculaire.

Le métabarcodage : une révolution pour les inventaires de diversité

À partir des années 2010, sous l'impulsion en particulier de l'Inrae, des travaux sur l'identification génétique des diatomées, favorisés par l'apparition du séquençage à haut



→ Figure 1. Corrélation entre les valeurs de l'Indice biologique diatomées (IBD) obtenues avec des inventaires réalisés par microscopie d'une part et par métabarcodage d'autre part. (Rivera et al. 2019).

C'est pourquoi l'un des axes majeurs de travail est de produire un indicateur basé sur le métabarcodage, qui pourra fournir des résultats d'évaluation les plus congruents possibles avec ceux de l'IBD, en même temps que se mettent en place progressivement les conditions de la standardisation des protocoles.

Dans ce contexte, différentes études tendent à montrer qu'on peut non seulement obtenir des résultats pertinents avec des inventaires en métabarcodage (Figure 1), mais qu'en plus, il y a une forte homogénéité des résultats entre laboratoires, même lorsqu'un protocole standard n'est pas imposé.

Les études se poursuivent ainsi sur la comparabilité des inventaires réalisés en métabarcodage et en microscopie, sur la complétion des bases de données de référence utilisées pour attribuer les séquences génétiques à une espèce donnée (par exemple tous les taxons de l'IBD n'ont pas encore de *barcode*), et sur l'amélioration de la robustesse des protocoles informatiques.

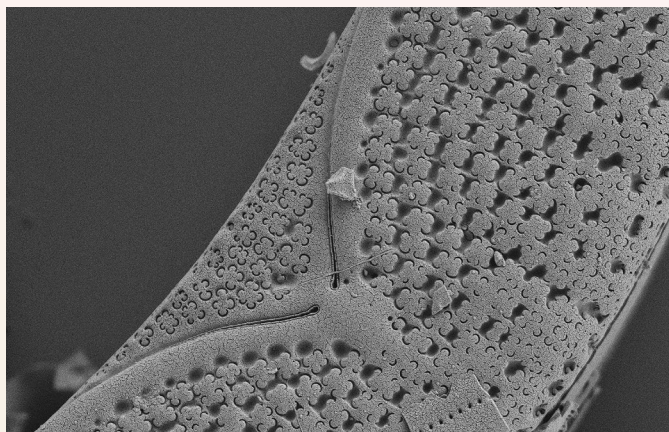
Une réponse à d'autres enjeux de biodiversité

La DCE n'est pas le seul cadre d'application de ces méthodes, qui peuvent répondre, dès maintenant, à d'autres enjeux de biodiversité. Dans le cadre du programme « Sites Rivières sauvages » par exemple, les diatomées sont utilisées comme organisme sentinelle pouvant renseigner rapidement sur toute évolution du milieu. Elles répondent alors davantage à une problématique de conservation de sites en bon état écologique, que de restauration de la qualité des eaux. Dans ce cas, les fortes réso-

FOCUS 1

Les diatomées, des « indicis » de choix

Les diatomées sont des microalgues unicellulaires. Largement répandues dans les milieux aquatiques, elles contribuent pour 1/5^e à l'activité photosynthétique sur la planète, ce qui correspond à 40 % de la production primaire nette pour l'océan. Le groupe taxinomique des diatomées présente une richesse spécifique remarquable avec environ 12 000 espèces décrites. Il en existerait potentiellement 100 000. Deux grands groupes morphologiques existent : les centriques (symétrie radiaire) et les pennées (symétrie bilatérale). Ces algues microscopiques peuvent être libres dans l'eau (formes planctoniques) ou bien fixées au substrat (formes benthiques). La composition des assemblages, ainsi que les formes de vie, diffèrent en fonction des conditions environnementales auxquelles elles sont exposées. Leur cycle de vie court et leur réactivité aux facteurs abiotiques (pH, température, oxygène dissous, nutriments...) et aux pressions environnementales (pollution organique, eutrophisation...) leur permettent d'intégrer les conditions du milieu en quelques semaines. Ajouté à leur importante biomasse dans les écosystèmes, elles constituent des indicateurs fiables pour évaluer l'état des milieux aquatiques.



→ Détail d'une diatomée du genre *Epithemia* (Nouvelle-Calédonie). Les ornements visibles en microscopie constituent un véritable code, spécifique de chaque espèce de diatomées. © G. Gassiole/MicPhyc

lutions spatiales et temporelles de suivi par métabarcodage ont permis de produire quatre indicateurs utiles à l'évaluation de la conservation : suivi de stations référentes, détection et suivi de taxons ou de variants atypiques d'intérêt, détection et suivi d'espèces envahissantes, suivi précis d'une perturbation. Cet exemple, parmi d'autres, montre que le métabarcodage des diatomées peut d'ores et déjà être compté au titre des outils de surveillance et d'évaluation des milieux aquatiques, et être utilisé en tant que tel ou en complémentarité des méthodes traditionnelles.

Perspectives

Cependant, après une décennie féconde en développements, l'implémentation des méthodes de bio-indication *via* l'ADN des diatomées semble marquer le pas. Des questions subsistent, d'ordre technique, économique, social ou encore environnemental.

Dans le même temps, la recherche avance. Ainsi, le concept d'indicateurs s'affranchissant de la taxonomie (*taxonomy free*), c'est-à-dire ne se basant plus sur des listes d'espèces,

mais utilisant directement l'information génétique obtenue lors du séquençage, est de plus en plus mis en avant. Les outils qui résulteront de ce type d'approches seront très différents, dans leur conception et dans leurs objectifs, des indicateurs à visée réglementaire actuels. Ils pourraient alors venir enrichir la palette des méthodes de surveillance et d'évaluation disponibles, en complémentarité des indicateurs traditionnels éprouvés. ■

AUTEURS

Olivier Monnier, OFB, Direction de la recherche et de l'appui scientifique, **Valentin Vasselon**, Scimabio Interface

CONTACT

olivier.monnier@ofb.gouv.fr

BIBLIOGRAPHIE EN LIGNE

bit.ly/revue-biodiversite10

Focus 2

Le principe d'un inventaire de diatomées par métabarcodage

L'inventaire de diatomées, autrement dit la détermination d'une liste de taxons présents et leur quantification, par métabarcodage, doit suivre une procédure précise garantissant un niveau de fiabilité suffisant à l'évaluation de l'état écologique. La méthode d'échantillonnage est identique à celle utilisée pour la microscopie ; elle se fait par grattage de pierres ou de végétaux immergés, supports sur lesquels les diatomées se développent. L'étape suivante consiste à extraire l'ADN de l'échantillon après centrifugation (ce qui permet de séparer les diatomées du liquide qui les entoure). À partir de l'ADN total ainsi obtenu, un fragment d'ADN représentatif des diatomées (*barcode* d'une partie du gène

chloroplastique *rbcl*) est ciblé et amplifié (technique PCR ou *Polymerase Chain Reaction*). Les produits issus de l'amplification sont ensuite séquencés (les plateformes de séquençage à haut débit permettent de traiter plusieurs centaines d'échantillons en même temps). Après traitements bio-informatiques, seules les séquences présentant 95 % ou plus de similarité sont conservées. En les confrontant à une base de référence, ces séquences sont alors attribuées à des taxons connus ; ce qui permet d'inventorier les espèces de diatomées présentes dans l'échantillon prélevé. Dès lors, les inventaires ainsi obtenus sont utilisables pour calculer des indices de qualité de l'eau.

