

# ADN Environnemental : Evaluer l'état écologique de milieux aquatiques à partir de l'ADN des diatomées

Mots-clés : diatomées, ADN, métabarcoding, séquençage à haut débit, bio-indication, état écologique

Type d'outil	Milieux étudiés	Disciplines mobilisées	Destinataires
Bio-indicateur (outil de mesure biologique)	- Cours d'eau - Lacs	- Ecologie - Bio-informatique - Biologie moléculaire	- Chercheurs - Gestionnaires

## OBJECTIF

Améliorer l'évaluation de l'état écologique de milieux aquatiques grâce à une nouvelle approche de bio-indication à haut-débit basée sur l'ADN environnemental.

## CONTENU DE L'OUTIL

Développée depuis les années 2010, l'analyse des assemblages de **diatomées benthiques** via l'ADN environnemental **renforce et élargit** les manières d'évaluer l'état écologique des masses d'eau pour l'élément de qualité biologique « phytobenthos ». Basée sur l'identification moléculaire des espèces, cette méthode s'ajoute à la méthode traditionnelle basée sur l'identification morphologique des espèces.

Elle permet d'obtenir un inventaire taxonomique moléculaire des espèces de diatomées à partir de l'ADN extrait d'un prélèvement de biofilm environnemental (communauté de microorganismes adhérant à un substrat). Cet inventaire est ensuite utilisé pour calculer une note d'indice de qualité.

L'**ADN** (acide désoxyribonucléique), contenu dans le noyau et les organites de chaque cellule de tout être vivant, porte les informations génétiques. Les **diatomées** sont des algues unicellulaires microscopiques caractérisées par une forte sensibilité à la pollution et des préférences écologiques spécifiques. Elles sont qualifiées d'espèces bio-indicatrices.

L'ADN de tous les organismes est extrait des échantillons de biofilm, puis un court fragment d'ADN spécifique aux diatomées est amplifié et séquencé grâce aux technologies de séquençage à haut-débit (métabarcoding). Il est alors possible de déduire les espèces de diatomées présentes sur le lieu d'étude et d'en déduire l'état écologique de la masse d'eau.

## L'ESSENTIEL

Grâce à un échantillonnage simple et un séquençage haut débit, l'identification des diatomées basée sur l'ADN est une nouvelle approche, complémentaire à la méthode classique d'identification morphologique des espèces. Elle permet d'obtenir des indices de qualité écologique des masses d'eau à plus haute fréquence.

AVANTAGES	INCONVENIENTS
<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Bon rapport coût/efficacité</li> <li>+ Répétable, reproductible et transférable</li> <li>+ Haut-débit permettant d'aborder de larges échelles spatiales et temporelles</li> <li>+ Bibliothèques de référence connectant séquence ADN et taxonomie sans mobiliser d'experts en taxonomie</li> <li>+ Méthode testée avec succès sur un grand nombre de cours d'eau et de lacs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ADN et morpho-taxonomie sont deux façons différentes d'aborder un même échantillon qui produisent de ce fait des inventaires partiellement différents</li> <li>- Peut devenir coûteux si mis en œuvre pour un faible nombre d'échantillons</li> <li>- La méthode n'a pas encore fait l'objet d'une normalisation et n'est pas encore validée dans le cadre de la surveillance DCE</li> </ul>

## MISE EN ŒUVRE

Moyens humains	Compétences	Matériel	Coût
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 à 2 personnes (+ laboratoire)</li> <li>- Temps de mise en œuvre en station identique à celui d'un échantillonnage classique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Écologie</li> <li>- Taxonomie</li> <li>- Biologie moléculaire : traitement de l'échantillon au laboratoire (extraction ADN, amplification PCR, séquençage ADN)</li> <li>- Informatique : traitement des données</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Echantillonnage (campagnes de suivi)</li> <li>- Laboratoire équipé pour réaliser : extraction ADN, amplification PCR (barcode ADN) et préparation des librairies de séquençage</li> <li>- Technologie de séquençage haut-débit (en interne ou sous-traitance via une plateforme de séquençage)</li> <li>- Traitement des données (traitement bio-informatique, bibliothèque de référence des barcodes, analyse des assemblages de diatomées et/ou calcul des métriques de bio-indication)</li> </ul>	<p>Le rapport coût-efficacité dépend du nombre d'échantillons par séquençage (plus le nombre d'échantillons analysés en même temps sera grand, plus le coût sera intéressant).</p>

**NB : la plupart de ces étapes peuvent être sous-traitées.**

## CONTEXTE

A l'échelle européenne, la **Directive Cadre sur l'Eau** (DCE) demande l'atteinte du bon état écologique pour les milieux aquatiques. Seulement 40 % des eaux de surface d'Europe sont en « bon » ou « très bon » état écologique. Des méthodes d'évaluation ont été développées pour rendre compte de cet état écologique. Elles sont basées sur des éléments de qualité biologique ou de bio-indicateurs qui en découlent.

L'outil classique de bio-indication est basé sur l'identification morphologique des espèces. Cette méthode repose sur la mobilisation d'experts en taxonomie, ce qui limite la comparabilité des évaluations entre experts et dans le temps. L'analyse de l'ADN environnemental vient ainsi compléter le panel d'outils disponibles.

Suite aux progrès de ces dernières années sur le développement d'approches d'identification basées sur l'ADN (métabarcoding ADN) couplées au séquençage massif de l'ADN, les méthodes utilisant l'ADN environnemental pour réaliser des inventaires taxonomiques dans les masses d'eau ont été développées. En particulier, le bio-indicateur « phytobenthos » nécessitant d'inventorier les espèces de diatomées présentes dans un échantillon de biofilm benthique a fait l'objet de nombreux développements. Cette méthode n'est toutefois pas infaillible et un regard critique d'expert en taxonomie sur les résultats est souvent nécessaire.

## PRINCIPES

### Etapes de mise en œuvre

De l'échantillonnage au calcul d'indices de qualité, les différentes étapes détaillées ci-dessous composent l'approche moléculaire en métabarcoding basée sur l'ADN environnemental des diatomées (figure 1).

Les diatomées se développent au sein d'un biofilm aquatique, qui est prélevé par brossage de substrats durs dans le milieu aquatique superficiel. Il est préconisé d'effectuer les prélèvements de façon standardisée en suivant les recommandations du rapport technique du Comité Européen de Normalisation (CEN) qui recommande des méthodes de préservation des échantillons compatibles avec un traitement en biologie moléculaire (CEN, 2018).

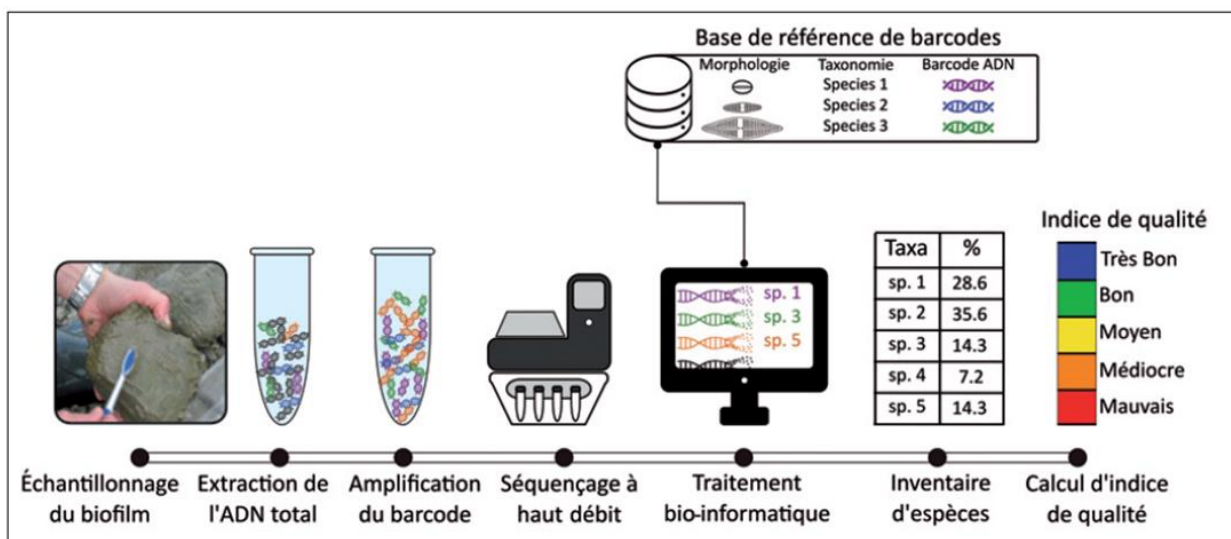


Figure 1. Principales étapes de l'approche moléculaire en métabarcoding pour la bio-indication (Vasselon et al., 2019 - TSM n°5-2019)

Les échantillons sont amenés en laboratoire où l'ADN total est extrait. Notons que dans ce cas l'ADN environnemental est un mélange d'ADN extracellulaire (libre dans les biofilms) et intra-cellulaire (dans les cellules de diatomées). Un barcode, courte région du génome différente pour chaque espèce et permettant leur identification<sup>1</sup>, est amplifié avec la technique PCR (réaction en chaîne par polymérase, méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*).

Après avoir été purifiés et étiquetés, les produits PCR de plusieurs échantillons sont rassemblés (jusqu'à 380 en simultané à ce jour) et « lus » (séquencés) par séquençage massif, en général au sein d'une plateforme de séquençage.

Les lectures de séquences (reads) sont ensuite soumises à différents traitements bio-informatiques afin de réaliser un tri de qualité. Elles sont ensuite confrontées à une bibliothèque de références de barcodes afin d'associer une taxonomie (c'est-à-dire une identité) à chaque groupe de séquences, ce qui permet d'aboutir à un inventaire taxonomique. Pour les diatomées, une bibliothèque de référence (Diat.Barcode) curée et enrichie régulièrement par des experts internationaux, est disponible en accès-libre : <https://www6.inrae.fr/cartel-collection/Barcoding-database>

Enfin, grâce aux données de sensibilité des espèces identifiées et à leurs abondances relatives (proportion de reads par espèce), les assemblages de diatomées sont caractérisés et les valeurs des indices diatomiques (ex : IBD, IPS) peuvent être calculés.

### **Evaluation de l'état écologique par les deux approches :**

Que ce soit via l'approche basée sur la reconnaissance morphologique des cellules (microscopie) ou via la variabilité des séquences ADN (métabarcoding, figure 1), on obtient des inventaires d'espèces de diatomées suffisamment robustes pour permettre de calculer des indices d'état écologique des milieux aquatiques. Cependant comme ces approches sont fondamentalement différentes et possèdent chacune leurs propres biais méthodologiques, il est normal et attendu que la détection et la quantification des espèces varient entre elles.

<sup>1</sup> Celui retenu pour les diatomées est un fragment du gène chloroplastique *rbcl*.

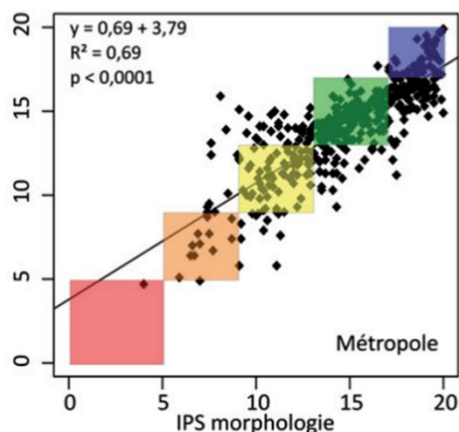


Figure 2- Corrélation entre notes d'indice de polluosensibilité spécifique (IPS) morphologique et d'IPS moléculaire pour 461 sites de rivières françaises en Métropole (Vasselon et al., 2019 - TSM n°5-2019)

Il est notamment attendu que les espèces à gros biovolumes, généralement représentées par un faible nombre d'individus en microscopie soient dominantes dans les inventaires moléculaires du fait d'un plus grand nombre de copies du gène ciblé en métabarcoding. A l'inverse, les cellules de petite taille généralement très abondantes dans les inventaires morphologiques deviennent minoritaires dans les inventaires moléculaires car elles contiennent peu de copies du gène ciblé. Cet exemple permet aussi de souligner la complémentarité des deux approches pour apprécier au mieux la diversité des diatomées.

Bien que des variations puissent être observées dans les inventaires d'espèces, les évaluations d'état écologique obtenues sont congruentes entre les deux approches et cohérentes avec l'analyse de l'état écologique attendu des milieux étudiés (figure 2).

## PERSPECTIVES ET PRECONISATIONS

Il est préconisé d'utiliser les deux méthodes de bio-indication en parallèle.

En effet, l'approche basée sur l'ADN environnemental peut être mise en œuvre facilement comme outil massif de surveillance et peut permettre par exemple d'identifier des points chauds de contamination ou de dysfonctionnement. Quant à la méthode traditionnelle, elle peut servir pour valider la fiabilité d'analyses basées sur l'ADN (par exemple sur quelques échantillons), En s'appuyant notamment sur des chroniques de données morphologiques acquises parfois sur plusieurs années voire décennies.

Cette méthode de bio-indication est une méthode en pleine expansion, prometteuse. Même si les standards, facilitant l'application de la méthode basée sur l'ADN, ne sont pas encore disponibles et que les premières applications réglementaires (DCE) ne sont pas prévues avant 2027.

## PERSONNES RESSOURCES

### Agnès BOUCHEZ

Labo/structure : CARTEL, INRAE  
agnes.bouchez@inrae.fr  
Tel : 04 50 26 78 60

### Valentin VASSELON

Labo/structure : Scimabio Interface, Thonon-les-Bains  
valentin.vasselon@scimabio-interface.fr  
Tel : 07 88 04 51 64

## DOCUMENT(S) SOURCE

Vasselon, V., et al. "Évaluer la pollution des milieux aquatiques avec l'ADN des diatomées: où en sommes-nous ?." *Techniques Sciences Méthodes* 5 (2019): 53-70.

## AUTEUR(S)

Valentin VASSELON, Frédéric RIMET, Isabelle DOMAIZON, Olivier MONNIER, Yorick REYJOL, Agnès BOUCHEZ

## STRUCTURE(S) PORTEUSE(S) DU PROJET

CARTEL (Centre alpin de recherche sur les réseaux trophiques des écosystèmes limniques), UMR 42, Thonon-les-Bains, INRAE (Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement), Université Savoie Mont-Blanc  
Scimabio Interface, Thonon-les-Bains  
OFB (Office Français de la Biodiversité)

## SITES ET OBSERVATOIRES DE LA ZABR MOBILISES

L'Observatoire des Lacs Alpains (OLA) et le site SIPIBEL.

## THEMATIQUES ZABR ABORDEES

Flux Polluants, Ecotoxicologie, Ecosystèmes (FPEE)

## PROJET

L'élaboration de cet outil a été développé dans le cadre de plusieurs projets, et notamment dans le cadre de deux études dirigées par INRAE et financées par l'OFB, réalisées sur les cours d'eau de Mayotte, entre 2013 et 2018 et sur ceux de France métropolitaine, entre 2016 et 2018.

## BIBLIOGRAPHIE

LECOMTE Vivien, 2020. *L'ADN environnemental : une révolution pour l'étude de la biodiversité*. In : notre-planete.info [en ligne]. 4 février 2020. [consulté en 2021] Disponible à l'adresse : <https://www.notre-planete.info/actualites/4354-ADN-environnemental-biodiversite>

VASSELON Valentin, 2020. *Évaluer la qualité écologique des milieux aquatiques avec l'ADN des diatomées*. In : Actes de la journée ADN Environnemental, Lyon, 23 janvier 2020. ZABR. 72p. Disponible à l'adresse : [http://www.graie.org/zabr/zabrdoc/Actes\\_Adne\\_web.pdf](http://www.graie.org/zabr/zabrdoc/Actes_Adne_web.pdf)

CEN, 2018. TR 17245, *Water quality - Technical report for the routine sampling of benthic diatoms from rivers and lakes adapted for metabarcoding analyses*. CEN Stand. 1-8.

CHONOVA Teofana, et al., 2019. *Benthic diatom communities in an alpine river impacted by waste water treatment effluents as revealed using DNA metabarcoding*. In : *Frontiers in microbiology*, vol. 10, p. 653. Disponible à l'adresse : <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00653>