

LES

# Rencontres

## Séquençage d'ADN, traits bioécologiques... Mayotte, laboratoire pour la bioindication innovante

*Compte rendu de la journée d'information du 19 novembre 2018, sur le potentiel d'utilisation opérationnelle, à Mayotte, du métabarcoding de l'ADN intracellulaire ou environnemental, et de la journée de restitution des bioindicateurs pour les cours d'eau de Mayotte du 20 novembre 2018, organisées à Vincennes par l'Agence française pour la biodiversité (AFB).*

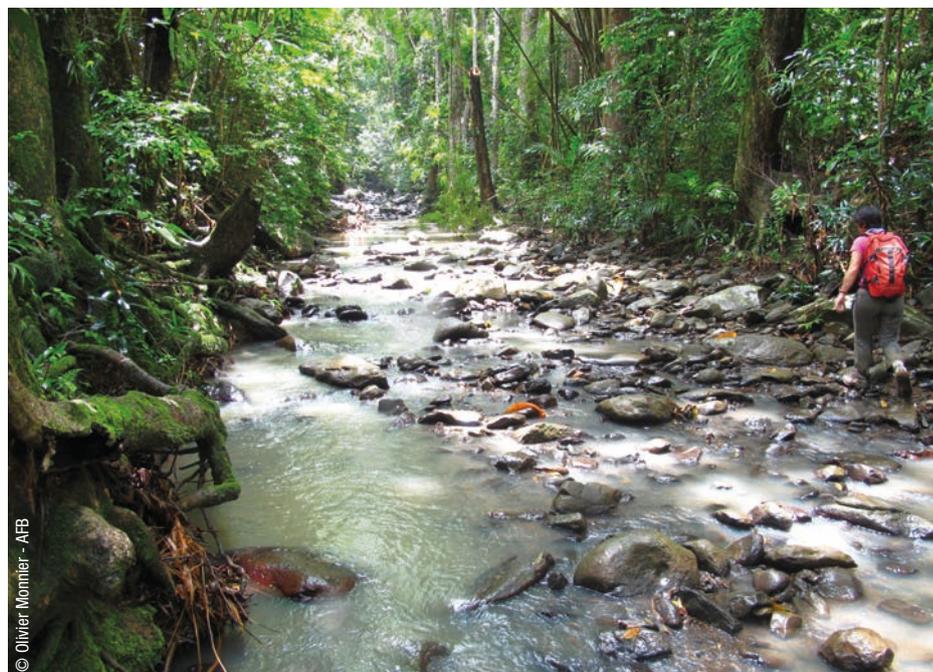
La mise en œuvre de la directive cadre sur l'eau (DCE) à Mayotte est l'occasion d'explorer de nouvelles approches en matière de bioindication. C'est l'un des enjeux du partenariat qui associe l'Agence française pour la biodiversité (AFB) à l'Institut national de la recherche agronomique (Inra) et d'autres partenaires pour le développement de méthodes opérationnelles basées sur les diatomées et les invertébrés benthiques des cours d'eau mahorais.

Situé à l'entrée du canal de Mozambique, à 8 000 km de la France métropolitaine, l'archipel de Mayotte est devenu en 2011 le 101<sup>e</sup> département français. Ce territoire de 376 km<sup>2</sup>, densément peuplé, représente un véritable défi pour la préservation de ses milieux naturels, qui abritent une biodiversité remarquable et fragile. C'est le cas notamment de ses rivières, dont la surveillance et la gestion relèvent désormais du cadre réglementaire européen de la directive cadre sur l'eau (DCE).

Le schéma directeur d'aménagement et de gestion des eaux (Sdage) 2010-2015 de Mayotte a délimité 26 masses d'eau de type « cours d'eau », toutes sur l'île principale de Grande-Terre : pour chacune d'entre elles, l'état écologique et chimique doit être évalué à chaque cycle DCE, au moyen de méthodes validées à l'échelle européenne. Pour la communauté scientifique et les gestionnaires locaux, cette évaluation s'inscrit dans un contexte très différent de celui qui prévaut en métropole ou dans les autres départements d'outre-mer. Les rivières de Mayotte, au

bord desquelles se concentre une population en croissance rapide, subissent des pressions anthropiques importantes jusqu'à l'amont des bassins : défrichage

des berges, macrodéchets, rejets urbains diffus et impact des lavandières, qui font souvent la lessive à même la rivière.



Une station de mesures sur une rivière de Mayotte peu impactée par les activités humaines.

© Olivier Monnier - AFB

## Des outils attendus pour le prochain cycle de gestion

La collecte de données pour la surveillance des cours d'eau de Mayotte est récente : elle n'a débuté qu'en 2006 pour les macroinvertébrés benthiques, en 2007 pour les diatomées et en 2008 pour la chimie. En revanche elle a été menée sur pas moins de 48 stations de mesures (15 stations du réseau de contrôle et de surveillance [RCS] auxquelles se sont ajoutées, à partir de 2013, 18 stations potentielles de référence et 15 stations additionnelles « polluées », voir figure 1), soit le réseau le plus dense de France. Dans le contexte mahorais, l'évaluation de l'état écologique pour le prochain cycle de gestion DCE (2022-2027) nécessite le

développement d'outils faciles à mettre en œuvre ; elle fournit également l'occasion d'expérimenter des approches innovantes, en particulier l'utilisation de techniques basées sur l'ADN intracellulaire pour l'acquisition des données biologiques.

C'était le double objectif d'un partenariat lancé en 2013 entre l'AFB et l'Inra, sur les compartiments des macroinvertébrés benthiques (MIB) et des diatomées. Cette année-là, un premier état des lieux, mené par défaut sur la base des classes d'état physico-chimiques du SEQ-Eau (système d'évaluation de la qualité des eaux), a permis d'identifier les principaux gradients de pression. Menant en parallèle la construction des indices et le test des méthodes basées sur le séquençage

massif de l'ADN, l'action de recherche s'est poursuivie sur le terrain (2013-2015 : échantillonnage) et au laboratoire (2013-2016 : inventaires), avant l'analyse des données et la construction des métriques (2016-2018). Après six années de travaux, les équipes scientifiques ont présenté un bilan de cette action, fin 2018 à Vincennes, dans les locaux de l'AFB : le 19 novembre, une journée d'information sur les avancées récentes des approches basées sur l'ADN pour la bioindication, en France métropolitaine et à Mayotte, était proposée aux professionnels concernés. Le lendemain, le groupe de travail (scientifiques de l'Inra, de l'Université de Lorraine, des bureaux d'études Ethycy et Micphyc, experts de la Direction de l'eau et de la biodiversité, de la Direction de l'environnement, de l'aménagement et du logement de Mayotte et de l'AFB) se retrouvait pour une journée de restitution et de discussion des bioindicateurs proposés.



Figure 1. Le réseau de stations de mesures utilisé pour le développement des bioindicateurs de Mayotte (source : V. Vasselon *et al.*, Inra Thonon). ● Stations du réseau de contrôle et de surveillance (RCS), ● Stations potentielles de référence, ● Stations additionnelles « polluées ».

## Diatomées : approche par espèces ou approche par traits ?

Les communautés de diatomées de Mayotte présentent une grande diversité :

### Les traits ou guildes bioécologiques

Les « traits » correspondent à des caractéristiques indicatrices du fonctionnement écologique de l'espèce :

- morphologiques (p. ex. longueur ou biovolume de la cellule) ;
- physiologiques (p. ex. capacité à fixer l'azote) ;
- phénologiques (p. ex. vitesse de division cellulaire) ;
- ou liées à leur mode de vie (p. ex. mode de fixation au substrat).

Il est possible d'utiliser ces traits pour caractériser un gradient de pollution (p. ex. pollution organique). Ces traits sont souvent communs à l'ensemble des espèces d'un genre, voire d'une famille, ce qui permet de simplifier grandement l'acquisition des données biologiques, puisque l'identification des individus jusqu'au niveau de l'espèce n'est plus nécessaire.

384 taxons inventoriés au niveau de l'espèce, dont l'identification reste pour nombre d'entre eux difficile et l'écologie mal connue. En réponse, l'équipe scientifique (F. Rimet, V. Vasselon, K. Tapolczai, A. Bouchez, Inra) a mené en parallèle le développement de deux indices distincts : l'un basé classiquement sur des métriques taxinomiques, à l'image de l'indice biologique diatomées (IBD) utilisé en métropole, et l'autre basé sur les traits morphologiques (classe de taille, rapport longueur/largeur...) ou écologiques (motilité, fixation de l'azote...) des diatomées. Innovante, cette seconde approche permet de s'affranchir des écueils des indices actuels, en particulier en contexte tropical : un grand nombre d'espèces aux écologies similaires qui induit une forte redondance sur l'évaluation écologique, ainsi qu'une forte méconnaissance de leur taxinomie. En comparaison, les traits, pour la plupart caractéristiques du genre (et non de l'espèce), sont bien moins nombreux et leurs dynamiques par rapport aux gradients anthropiques sont donc plus faciles à prédire.

Ces deux indices sont aujourd'hui finalisés au plan scientifique. Des seuils de classes d'état écologique ont été proposés (figure 2). Le guide pour la mise en œuvre des méthodes et la flore des diatomées des cours d'eau de Mayotte sont en cours de rédaction. Précisions techniques, l'indice taxinomique « espèce » prend en compte 111 espèces (les plus courantes localement) et repose sur deux métriques : l'une répondant au gradient « nutriment » et l'autre au gradient « matière organique et matière en

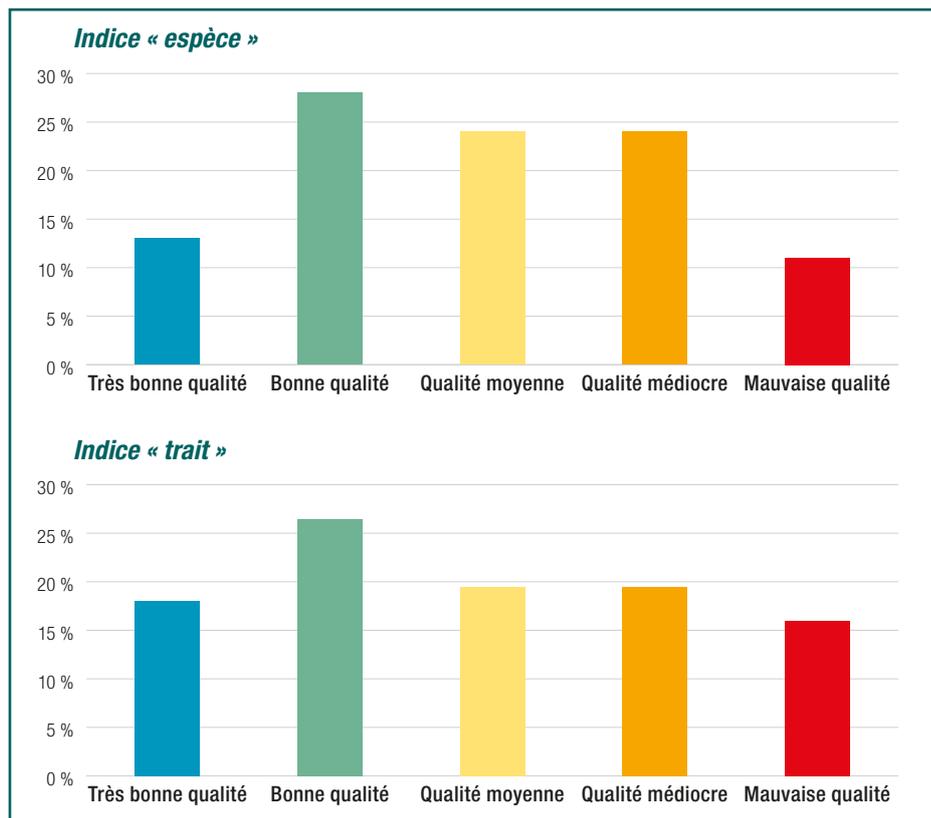


Figure 2. Distribution des 158 opérations de contrôle, réalisées à Mayotte dans le cadre du programme de développement des indices diatomiques, dans les classes d'état écologique de la directive cadre sur l'eau (DCE) pour les indices « espèce » et « trait » (source : V. Vasselon *et al.*, Inra Thonon).

suspension ». En raison de l'impact plus fort de la matière organique sur le milieu par rapport aux nutriments, les deux métriques ont des poids différents dans le calcul de l'indice final. Pour le second indice, les inventaires taxinomiques ont été traduits en inventaires de traits, et leurs réponses aux deux sources de pollutions précitées ont été modélisées : les cinq traits présentant les réponses les plus significatives ont été conservés pour le calcul de l'indice. Les résultats obtenus

par ces deux approches sur des jeux de données réels suggèrent une complémentarité : l'indice « espèce » offre une plus grande stabilité, avec peu de variations autour des valeurs moyennes, tandis que l'indice « trait » s'avère plus sensible et discriminant, avec une importance accrue des espèces à fort biovolume. Une troisième voie est également envisageable : celle d'un bioindicateur combiné, agrégeant les deux méthodes selon des règles à définir (p. ex. en moyennant les deux indices). La conduite en parallèle des différentes méthodes au cours d'un cycle de gestion, apportera l'information nécessaire pour statuer sur la méthode d'évaluation la plus pertinente.

**Benjamin Jeannot**, Direction de l'eau et de la biodiversité, ministère de la Transition écologique et solidaire

En matière de bioindication, la départementalisation de Mayotte fournissait l'opportunité de développer des méthodes innovantes. Le défi a été relevé, avec la mise à disposition, aux côtés de bioindicateurs utilisant des métriques classiques, des méthodes basées sur les « traits » : en vue du prochain cycle DCE, il appartient aux gestionnaires de faire leur choix entre ces deux approches, ou de les combiner, pour réaliser au mieux l'évaluation des cours d'eau mahorais. En parallèle, la Direction de l'eau et de la biodiversité suit avec beaucoup d'intérêt les travaux menés autour de l'ADNe pour la bioindication. Les avancées réalisées à Mayotte attestent de l'intérêt de ces approches, qui sont susceptibles de générer un gain de temps et des économies à condition que la quantité d'échantillons à analyser soit suffisamment grande. Ces méthodes auront selon moi un rôle à jouer dans la surveillance réglementaire des cours d'eau dans l'après 2027, sans se substituer pour autant aux compétences en taxinomie et hydrobiologie, qui restent indispensables à une compréhension véritable des milieux.

## Macroinvertébrés : l'indice métropolitain I<sub>2</sub>M<sub>2</sub> en version originale mahoraise

Côté invertébrés benthiques, les travaux se sont appuyés sur 158 opérations d'échantillonnage menées entre 2008 et 2015 sur les trois réseaux déjà mentionnés (et 40 opérations supplémentaires sur le RCS depuis 2016). L'analyse des données a d'abord permis de caractériser les peuplements de l'île : 150 taxons ont été

Les campagnes de terrain que nous avons menées depuis 2006 ont d'abord permis, avec 150 taxons identifiés, de jeter les bases de la description des communautés de macroinvertébrés des cours d'eau de Mayotte. Sous influence biogéographique africaine et malgache, celles-ci présentent cependant un endémisme important et une richesse supérieure à ce que l'on observe, par exemple, à La Réunion. Le tout dans un contexte vraiment particulier, avec des niveaux de pressions anthropiques très importants sur certaines stations. Il reste encore un peu de travail pour caler les seuils de l'indice biologique développé par l'Université de Lorraine, mais en parallèle il faut maintenant préparer le terrain pour sa mise en œuvre : Ethyco va réaliser un guide d'identification des macroinvertébrés à destination des utilisateurs de l'indice, et jouera pleinement son rôle dans la formation des bureaux d'études intéressés.

identifiés (dont 26 % à l'espèce et 37 % au genre), avec un fort taux d'endémisme ; 86 d'entre eux appartiennent au groupe des insectes (détaillé dans la figure 3).

Le développement de l'indice a été mené par l'Université de Lorraine (P. Usseglio, A. Meyer) et Ethyco (N. Mary), selon une approche comparable à celle utilisée pour l'I<sub>2</sub>M<sub>2</sub> : 235 métriques, dont 66 décrivant la structure ou la composition taxinomique et 169 relevant de traits bioécologiques, ont été testées au regard de leurs réponses à cinq gradients de pressions (contamination par les nutriments, les matières en suspension et les matières organiques, ainsi que deux variables semi-quantitatives liées aux pressions « élevage-zébus » et « usage coutumier-lessive »). La sélection des métriques a été menée selon cinq critères : leur caractère généraliste, leur efficacité de discrimination, leur stabilité en conditions de référence, la robustesse vis-à-vis des jeux de données et la non-redondance des informations apportées. À l'issue de cet exercice, onze métriques ont été retenues. À ce stade plusieurs

indices ont pu être proposés (A. Meyer, Université de Lorraine), correspondant à différentes combinaisons de ces métriques et présentant un bon pouvoir de discrimination. Le jeu de données doit encore s'étoffer pour permettre de tester convenablement leur robustesse sur des stations significativement impactées, mais des alternatives utilisant des méthodes statistiques sont à l'étude pour lever rapidement cette difficulté en vue du choix de l'indice final. En matière de transfert, la rédaction d'un guide méthodologique et d'un manuel d'identification des macroinvertébrés benthiques de Mayotte est programmée ;

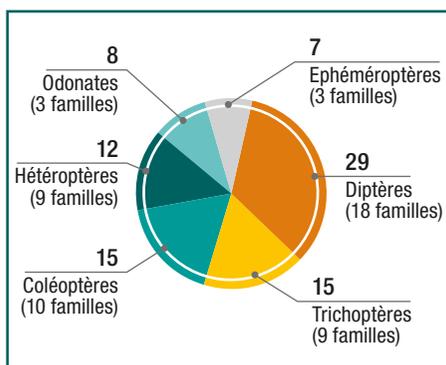


Figure 3. Nombre de taxons d'insectes identifiés à Mayotte (source : N. Mary, Ethyco).

un outil « diagnostic » complémentaire (à l'image de ce qui existe pour l'I<sub>2</sub>M<sub>2</sub>) pourrait aussi être proposé aux gestionnaires, permettant d'évaluer la probabilité d'impact significatif des grandes catégories de pressions sur les communautés autochtones.

## Bioindication et ADN : concept (presque) validé pour les diatomées

Outre le développement de métriques basées sur les traits, l'autre volet très novateur des travaux menés à Mayotte a porté sur l'exploration des possibilités ouvertes par l'utilisation des techniques basées sur l'ADN intracellulaire pour la bioindication. Ce champ émergent, porté par les progrès récents de la génomique et de la bioinformatique, consiste à extraire et à amplifier des fragments choisis d'ADN (ou barcodes) contenus dans les échantillons collectés *in situ*, puis à les séquencer ; l'identification taxinomique est alors réalisée informatiquement par rapprochement avec des bases de références génétiques aussi exhaustives que possible pour le groupe recherché, selon le principe du méta-barcoding (figure 4). Une telle approche

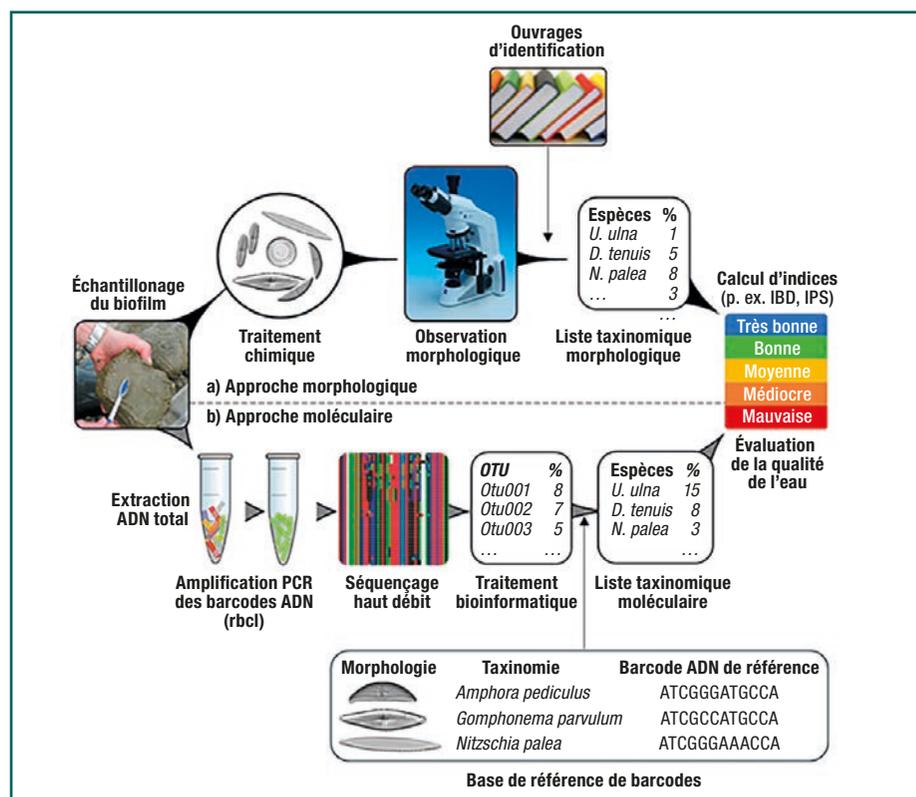


Figure 4. Les grandes étapes de la bioindication diatomées, par la méthode classique (identification morphologique) et par métabarcoding. OTU: unité taxinomique opérationnelle (source : Inra Thonon).

pourrait constituer une alternative avantageuse à la phase d'identification et de comptage des échantillons, qui nécessite de longues heures de travail au microscope et repose sur une expertise taxonomique parfois limitante (en particulier pour les écosystèmes tropicaux).

Dans le cas des diatomées, ce potentiel opérationnel est consolidé depuis plusieurs années par des travaux de l'Inra de Thonon-les-Bains, soutenus par l'AFB. C'est à Mayotte qu'a été mené le premier test à l'échelle d'un réseau de surveillance (V. Vasselon, Inra). À partir d'une collecte de terrain identique à celle employée pour les indices diatomées classiques (les diatomées sont récupérées par broyage du biofilm des pierres du fond de la rivière), les valeurs de l'indice diatomées IPS (indice de polluo-sensibilité spécifique, qui prend en compte l'ensemble des espèces présentes dans l'échantillon) sont calculées par la voie classique, et par un protocole de métabarcoding dédié. L'assignation taxonomique est réalisée au moyen de la base de références diatomiques en accès libre *Diat.barcode* (F. Rimet, Inra). Les corrélations sur le calcul de l'indice sont encourageantes, même s'il faudra travailler sur des jeux de données plus étendus pour conclure à l'opérationnalité du concept. Des perfectionnements méthodologiques ont été apportés par cette action sur différents

### Agnès Bouchez, Inra

**Le contexte social que connaît Mayotte est difficile et la sensibilisation à l'eau et à la préservation des rivières sont un enjeu crucial pour sa population. Le développement des bioindicateurs s'inscrit dans cette perspective : à l'issue de nos travaux, les gestionnaires locaux disposent désormais d'un jeu de méthodes opérationnelles pour diagnostiquer et améliorer l'état des cours d'eau mahorais. L'apport des acteurs locaux aura été précieux, notamment pour l'identification des stations de référence. Cette convention avec l'AFB a également été passionnante au plan scientifique : elle nous a permis de tester les méthodes utilisant l'ADN, pour la première fois sur un vrai réseau DCE, et dans un contexte où beaucoup d'espèces de diatomées et de macroinvertébrés étaient encore mal connues. À l'arrivée, c'est une réussite : nous avons pu créer rapidement les bases de références génétiques, et démontrer tout l'intérêt de nos approches en métabarcoding pour la bioindication.**

points de méthode, dont l'extraction de l'ADN des diatomées et la mise au point d'un facteur de correction pour résoudre le biais de quantification des taxons dans les inventaires liés aux différences de biovolume des diatomées (une diatomée de grande taille représente davantage d'ADN qu'une autre plus petite, mais le microscope dénombre, dans les deux cas, un seul spécimen).

Sur la base des travaux menés à Mayotte, un test de grande ampleur a été réalisé par la suite en métropole sur 447 sites du réseau de surveillance DCE (campagnes 2016-2017). La comparaison entre les

deux approches (S. Rivera, Inra) montre une corrélation encourageante entre les valeurs d'IBD « microscopie » et « métabarcoding », qui demande à être encore améliorée par des ajustements du traitement bioinformatique et surtout par la complétion de la base de références de barcodes. Maintenu depuis 2009 par l'Inra et enrichie en permanence à la faveur d'une coopération internationale, cette base comportait fin 2018 les barcodes de 924 espèces sur les 2 342 inventoriées dans les cours d'eau de France métropolitaine. *Diat.barcode* inclut les séquences de 33 % des 384 espèces présentes à Mayotte, dont 34 % des 111 espèces prises en compte par l'indice « espèce ». La base de référence est en cours de complétion pour Mayotte, dans le cadre de la réalisation de la flore des diatomées des cours d'eau de ce territoire.

En parallèle, des travaux ont également été menés à Mayotte pour préciser le potentiel de l'ADN pour la bioindication macroinvertébrés. L'approche actuelle, qui consiste à appliquer le métabarcoding sur un broyat d'invertébrés échantillonnés, comporte plusieurs écueils pour une utilisation dans le cadre de la DCE : biais de quantification (les relations entre quantité d'ADN et abondance des espèces restent à préciser), problèmes de fiabilité et d'incomplétude de la base de référence... Dans ce contexte, le travail mené à Mayotte a permis d'initier (N. Mary, Ethyco) la création d'une bibliothèque de barcodes pour la faune macroinvertébrée de l'archipel (23 Diptères et 36 Trichoptères séquencés à la fin 2018).



Les lavandières, une pression importante sur les communautés de diatomées et d'invertébrés benthiques des rivières de Mayotte.

## La validation des indicateurs DCE avant traduction réglementaire

Les attendus réglementaires de la DCE, en termes de surveillance et d'évaluation de la qualité des masses d'eau, imposent un cadre méthodologique très précis au développement des indicateurs.

Le schéma national des données sur l'eau (SNDE) stipule que l'élaboration des méthodes doit être faite sous la coordination technique de l'AFB, qui, s'appuyant sur les GT nationaux, fait appel à des organismes scientifiques. *In fine*, les méthodes sont approuvées par l'AFB et proposées à l'État (MTES), qui est chargé de prescrire les méthodologies employées pour l'application de la réglementation et les conditions de leur emploi.

L'évaluation technique d'un indicateur se base sur les rapports et les publications scientifiques relatives au développement de la méthode. Ces dernières, basées sur le système du *peer-reviewing* sont un excellent appui à la validation. Elles confirment que la démarche scientifique et les résultats obtenus sont robustes et cohérents. Les éléments pris en compte pour l'évaluation sont, entre autres : la robustesse du jeu de données relatives aux pressions et à la biologie, la construction des métriques et en particulier le traitement de la relation pressions-état écologique, le test de l'indicateur sur un jeu de données indépendant de celui ayant servi à sa conception, l'adéquation avec les exigences normatives de la DCE et la faisabilité de la mise en œuvre opérationnelle de la méthode (niveau de technicité requis, coût).

Une méthode d'échantillonnage alternative et non invasive est également étudiée (S. Rivera, Inra), utilisant les biofilms aquatiques comme capteurs naturels de l'ADNe libre provenant des invertébrés (avec à la clé un protocole de collecte simplifié et un impact quasi-nul sur les communautés). Les premiers résultats, encourageants, confirment et précisent la capacité des biofilms à adsorber de ce matériel génétique.

À l'issue de ces six années de travaux, l'action engagée à Mayotte par l'AFB et l'Inra a atteint son objectif premier : le développement des méthodes de bioindication « diatomées » et « macroinvertébrés benthiques » attendues pour l'évaluation DCE de l'état écologique des rivières mahoraises. Quelques points techniques ont encore été discutés par le groupe de travail lors de la réunion du 20 novembre, comme le calage des seuils d'état écologique, mais les méthodes

sont désormais scientifiquement validées et les guides d'utilisation sont en cours de réalisation : en parallèle du processus de validation réglementaire des indicateurs produits (voir encadré), mené par l'AFB et le ministère de la Transition écologique et solidaire, l'enjeu réside désormais dans leur transfert aux opérateurs qui les mettront en œuvre à Mayotte lors du prochain cycle de gestion (2022-2027).

Et si l'archipel part avec un cycle de retard sur les autres départements français dans la mise en œuvre de la DCE, il dispose en revanche d'un temps d'avance aux plans méthodologiques et conceptuels : la mise en œuvre des métriques basées sur les traits bioécologiques, de même que les avancées réalisées à Mayotte pour les applications du métabarcoding en bioindication, ouvrent des perspectives prometteuses pour l'avenir de la surveillance et de la gestion des milieux aquatiques... 2027, c'est demain ! ■

### Pour en savoir plus :

- Mondy C. *et al.* (2012). A new macroinvertebrate-based multimetric index ( $I_2M_2$ ) to evaluate ecological quality of French wadeable streams fulfilling the WFD demands: A taxonomical and trait approach. *Ecological Indicators* 18, 452-467.
- Poulet N. & Basilico L. (2019). L'ADN environnemental pour l'étude de la biodiversité. État de l'art et perspectives pour la gestion. Agence française pour la biodiversité. Collection *Rencontres-synthèse*, 72 p.
- Tapolczai K. *et al.* (2017). Taxonomy- or trait-based ecological assessment for tropical rivers? Case study on benthic diatoms in Mayotte island (France, Indian Ocean). *Science of the Total Environment* 607-608, 1293-1303.
- Vasselon V. *et al.* (2019). Évaluer la pollution des milieux aquatiques avec l'ADN des diatomées : où en sommes-nous ? *Techniques Sciences Méthodes* 114(5), 53-69.
- Vasselon V. *et al.* (à paraître 2019). Guide pour la mise en œuvre d'indices biologiques en outre-mer. Les indices diatomées Mayotte IDM<sub>sp</sub> et IDM<sub>trait</sub>. Agence française pour la biodiversité, collection *Guides et protocoles*.

### Organisation des journées techniques

Olivier Monnier, Agence française pour la biodiversité

### LES Rencontres

Directeur de publication : Christophe Aubel  
Coordination : Véronique Barre, Béatrice Gentil-Salasc  
Rédaction : Laurent Basilico, Olivier Monnier  
Réalisation : www.kazoar.fr  
Impression : Estimprim  
Impression sur papier issu de forêts gérées durablement  
Éditeur : AFB – 5, square Félix Nadar - 94300 Vincennes  
Disponible sur : <https://professionnels.afbiodiversite.fr/fr/rencontres>  
ISBN web : 978-2-37785-088-4  
ISBN print : 978-2-37785-089-1  
Gratuit

