

Les spécimens de collection au service de l'ADN environnemental : création d'une base de références moléculaire pour des expertises plus fiables

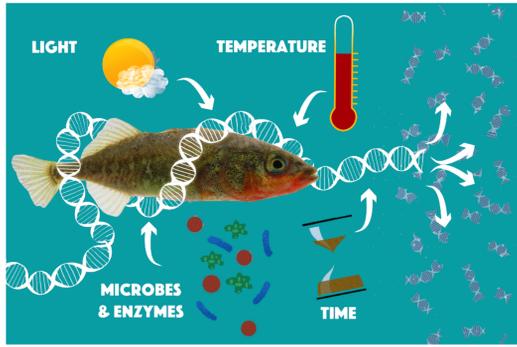
MENNESSON Marion I.^{1,*}, DETTAI Agnès², IGLESIAS Samuel P.³, BONILLO Céline¹, BUSSON Frédéric¹, DENYS Gaël P.J.^{1,4}

¹ UMR Biologie des organismes et écosystèmes aquatiques (UMR BOREA 8067), MNHN, CNRS, IRD, SU, UCN, UA, 57 rue Cuvier CP26, 75005 Paris, France.

² Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (UMR ISYEB 7205), MNHN, CNRS, UPMC, EPHE, SU, 57 rue Cuvier CP26, 75005 Paris, France.

³ Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (UMR ISYEB 7205), MNHN, CNRS, UPMC, EPHE, Sorbonne Université, Université des Antilles, Station Marine de Concarneau, Place de la Croix, 29900 Concarneau, France.

⁴ Unité Patrimoine Naturel – Centre d'expertise et de données (PatriNat 2006) OFB, CNRS, MNHN, 36 rue Geoffroy-Saint-Hilaire CP41, 75005 Paris, France.



Modifié d'après FISHBIO



Tout individu interagissant avec son environnement libère de l'ADN dans le milieu, qui sera ensuite dégradé par des facteurs biotiques (ex : bactéries) et/ou abiotiques (ex : température). En collectant l'ADN laissé par les individus, autrement appelé **ADN environnement** ou **ADNe**, il est possible de détecter indirectement leur présence et de déterminer l'espèce à laquelle ils appartiennent. Cet ADNe est souvent issu de cellules contenues dans des sécrétions, excréments, tissus perdus lors du renouvellement cellulaire etc., mais également d'individus morts ; témoignant ainsi de la **présence actuelle ou passée d'une espèce**.

Cette technique d'expertise moléculaire selon l'approche ADNe est en **pleine expansion** cette dernière décennie (cf. histogramme), notamment dans le **milieu aquatique**. Elle permet de **détecter des espèces rares**, de suivre la progression des **espèces exotiques envahissantes**, ou de réaliser des **inventaires de biodiversité**. Cette technique consiste à identifier chaque haplotype (ou MOTUs) d'un marqueur donné et amplifié à partir de l'ADN en suspension dans l'eau par comparaison avec des séquences bien identifiées.



Principales étapes pour inventorier des espèces basées sur l'ADNe :

1. Prélèvement échantillon d'eau (capsule)
2. Extraction ADN total (PCR avec amorces spécifiques)
3. Amplification d'un fragment de gène
4. Séquençage haut débit
5. Analyse bio-informatique
6. Inventaire des espèces et dépôt dans la base de références moléculaire

Problèmes liés à ce protocole :

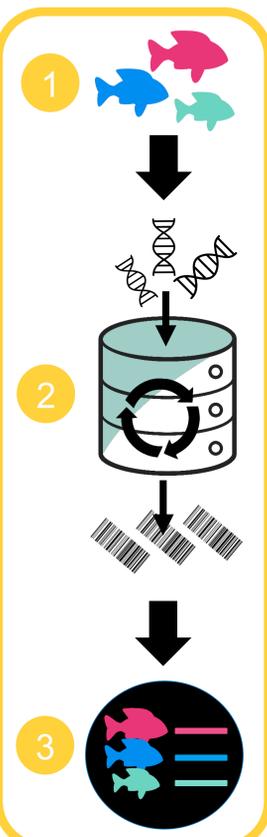
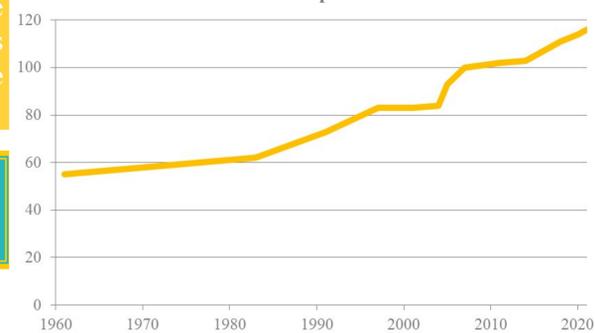
- Différents laboratoires travaillent sur un même projet – Scientifiques vs. Bureaux d'études → doublons et absence de partage
- Etape 3 :
 - Variabilité dans les marqueurs utilisés (12S, 16S, COI, Cytb) → absence d'homogénéisation des bases de données disponibles
 - Utilisation de mauvais marqueurs → absence de fonctionnement sur certains taxons
- Etape 6 :
 - Identification erronée des fragments ADN → absence de spécimens de référence (vivants ou collection) correctement identifiés
 - Constitution de base de données privée → parfois erronée
 - Seulement 10% des ADNmt (mitochondriaux) disposent d'un spécimen de référence (cf. GenBank)



Les connaissances taxonomiques ont fortement évolué en France métropolitaine et dans les DROM (Départements et Régions d'Outre-mer) en ichthyologie. L'**identification des espèces** est maintenant basée sur la **taxonomie intégrative** ; méthode combinant la morpho-méristique, les analyses moléculaires, les données sur le cycle de vie et la répartition des spécimens actuels, tout en incluant les spécimens de collections (cf. types). Cette méthode a permis de mettre en évidence de **nombreuses erreurs d'identification faites par le passé**.

Au vu de tous les problèmes énumérés, nous proposons de **réaliser une base de références moléculaire des espèces** présentes en **France métropolitaine** et dans les **DROM** en lien avec les **collections** pilotée par le Muséum national d'Histoire naturelle (MNHN) de Paris *via* l'Unité PatriNat.

Evolution du nombre d'espèces de poissons d'eau douce de France depuis 1960



- 1. Construction de la base de références moléculaire universelle**
 - ✓ Taxonomie d'entrée valide → identification par les spécialistes des taxons = 100% de fiabilité
 - ✓ Spécimens de référence (vouchers) déposés en collection avec un identifiant → collections du MNHN ou autres
 - ✓ Marqueurs standards (12S, 16S, COI, etc.) → séquençage de l'ADN mitochondrial (Hinsinger *et al.*, 2015)
 - ✓ Métadonnées associées au spécimen : photo, n° de collection (+ tag), lieu et date de collecte, identification (avec date), n° GenBank *etc.*
- 2. Gestion de la base de références moléculaire universelle**
 - ✓ Lien avec le référentiel national taxonomique TAXREF (Gargominy *et al.*, 2021)
 - ✓ Attribution d'une hiérarchie des séquences (Chakrabarty *et al.*, 2013; cf. tableau) → seules les séquences associées à un voucher sont autorisées
 - ✓ Mise à jour assidue des connaissances taxonomiques → nouvelle espèce, nouvelle occurrence, présence potentielle d'espèces allochtones *etc.*
 - ✓ Suivi de l'historique des données (versionnage)
- 3. Diffusion de la base de références moléculaire universelle**
 - ✓ Réalisation d'un data paper
 - ✓ Rendre les métadonnées accessibles → Open data
 - ✓ Garder l'autorité des séquences
 - ✓ Signaler les séquences issues des spécimens type (nomenclature Genseq)
 - ✓ Mettre en évidence les espèces non discernables avec les marqueurs mitochondriaux

adapté de Weigand *et al.*, 2019

Nomenclature Genseq (Chakrabarty <i>et al.</i> , 2013)	Matériel source	Priorité
Genseq-1	Types primaires : holotype, néotype, syntypes	+++
Genseq-2	Types secondaires : paratype, paralectotype	++
Genseq-3	Topotypes : spécimens non types provenant de la localité type	++
Genseq-4	Spécimens enregistrés en collection	+
Genseq-5	Photo seule	-
	Pas de spécimen en collection associé	---

Références

CHAKRABARTY P. *et al.*, – 2013. GenSeq: An updated nomenclature and ranking for genetic sequences from type and non-type sources. ZooKeys, 346: 29–41. DOI: zookeys.346.5753

GARGOMINY O. *et al.* – 2021. TAXREF v15.0, référentiel taxonomique pour la France. UMS PatriNat, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. <https://inpn.mnhn.fr/telechargement/referentielEspece/taxref/15.0/menu>

HINSINGER D.D. *et al.*, 2015. – Fishing for barcodes in the Torrent: from COI to complete mitogenomes on NGS platforms. DNA Barcodes, 3, 170–186. DOI: 10.1515/dna-2015-0019

WEIGAND H. *et al.*, 2019. – DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. Sci. Tot. Envir., 678: 499–524. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.247