

NUMERO
SPECIAL
#02

NOVAC

ingénierie & savoir-faire innovants

Innovations dans le domaine des Ressources Agronomiques pour la Recherche



Innovations dans le domaine des Ressources Agronomiques pour la Recherche

NUMERO
SPECIAL
#02
2022

SOMMAIRE

Innovations dans le domaine des Ressources Agronomiques pour la Recherche

EDITO	Michèle Tixier-Boichard	06
ENTRÉE EN COLLECTION	Processus introduction, démarches et outils pour la gestion sanitaire des collections de fruits à noyaux du CRB <i>Prunus-Juglans</i>	10
	Marine Delmas, Jean Leonetti, Delphine Racofier, Marie-Laure Greil, Frédéric Gauillard, Alain Blanc, Jean-Marc Audergon	
	Collecte d'échantillons dans le cadre du Centre de Ressources Biologiques Colisa (collection of ichthyological samples)	16
	Frédéric Marchand, Agnès Starck, Frédéric Lange	
	Projet BrasExplor : élargir les ressources génétiques du CRB BrACySol pour <i>Brassica oleracea</i> et <i>Brassica rapa</i>	21
	Cyril Falentin, Vincent Richer, Pascal Glory, Gwenaëlle Deniot, Julie Ferreira De Carvalho, Claudia Bartoli-Kautsky, Anne-Yvonne Guillermin, Erckelboudt, Sylvain Théréne, Stéphane Doré, Marie Gilet, Mathieu Rousseau-Gueutin, Laurène Gay, Anne-Marie Chèvre	
	Enrichir les catalogues des CRB : l'exemple des collections microbiennes des Centres de Ressources Biologiques du CIRM	28
	Anne Favel, Emmanuelle Helloin, Jean-Luc Legras, Perrine Portier, Florence Valence, Michel-Yves Mistou	
	Cani-DNA, un CRB qui a du chien ! Réseau de collecte de prélèvements de chiens par les vétérinaires pour la recherche biomédicale et la diversité génétique	34
	Catherine André, Nadine Botherel, Edouard Cadieu, Laetitia Lagoutte, Annabelle Garet, Jérôme Abadie, Laurent Tiret, Marie Abitbol, Rachel Lavoué, Guillaume Queney, Gilles Chaudieu, Richard Guyon	
CONSERVATION	Conserver les communautés microbiennes associées aux plantes viables et fonctionnelles : premiers résultats	45
	Missimahou Oussou, Géraldine Taghouti, Steven Jagline, Thomas Lerenard, Audrey Lathus, Cécile Dutrieux, Perrine Portier	

CONSERVATION	La cryoconservation des cellules germinales souches chez la truite arc-en-ciel : une stratégie pour restaurer l'intégralité d'un génotype d'intérêt	54
	Anne-Sophie Goupil, Stéphanie Kica, Tina Terrenne, Lionel Goardon, Alexandra Depincé, Charlène Labesse, Jean-Jacques Lareyre, Catherine Labbé	
	Conserver les sols : pourquoi et comment ?	65
	Nicolas Soler-Dominguez, Céline Ratié, Céline Faivre-Primot, Samuel Mondy	
	Cryoconservation d'apex de <i>Solanum tuberosum</i> et espèces apparentées par la technique de vitrification en gouttes	73
	Catherine Souchet, Florence Esnault, Jean-Eric Chauvin	
CONSERVATION	Développement d'une core collection pomme de terre	84
	Florence Esnault, Roland Pellé, Marie-Pierre Cann, Marie Bousseau, Marie-Ange Dantec, Catherine Souchet, Marie-Claire Kerlan, Jean-Eric Chauvin	
	Culture <i>in vitro</i>, assainissement et indexation de la Collection Igname du Centre de Ressources Biologiques Plantes Tropicales des Antilles	90
	Yoana faure, Suzia Gelabale, Rose-Marie Gomez	
	Gestion du stockage des échantillons Évaluer l'effet du temps et de la méthode de conservation du matériel végétal sur la quantité et la qualité de l'ADN extrait	99
	Matthieu Lingrand, Caroline Scotti-Saintagne, Sylvie Oddou-Muratorio, Marianne Correard, Olivier Gilg, Franck Reï, Anne Roig, Patrice Brahic	
CONSERVATION	Entretenir des collections d'invertébrés d'intérêt agronomique sur hôtes vivants : un enjeu patrimonial et des contraintes spécifiques	112
	Sylvie Pagès, Nadine Sellier, Philippe Castagnone	
	Interprétation de l'âge à partir des écailles sur des espèces de salmonidés lacustres, le corégone (<i>Coregonus sp.</i>) et l'omble chevalier (<i>Salvelinus alpinus</i>)	121
	Valérie Hamelet, Chloé Goulon, Frédéric Marchand	
	Les automates de phénotypage à haut débit du CIRM	125
	David Navarro, Victoria Chuat,	
CARACTÉRISATION	Le Centre ARCAD à Montpellier : conserver l'agrobiodiversité pour adapter les cultures aux changements climatiques et aux nouvelles pratiques agricoles	130
	Jean-Marie Proserpi	
	La spectrométrie de masse MALDI-TOF : un outil de diagnostic pour l'identification et le typage des bactéries pathogènes des poissons	133
	Eric Duchaud	
	Caractérisation de la collection caprine de la Cryobanque nationale pour une meilleure gestion des races menacées	144
	Coralie Danchin	
CARACTÉRISATION	SAMBO : Biobanking et extraction automatisée d'ADN de microbiotes	152
Christian Morabito		

DISTRIBUTION	Les outils de suivi de la relation client d'un Centre de Ressources Biologiques	155
	Victoria Chuat, Florence Valence	
	Présentation du portail d'accès aux ressources biologiques du pilier animal de RARe	165
	Sylvain Marthey, Aurélie Delavaud, Nicolas Marthey, Camille Méal, Michèle Tixier-Boichard	
SUPPORT	Déploiement de Systèmes de Management de la Qualité dans les Centres de Ressources Biologiques de l'Infrastructure de Recherche RARe	174
	Mélanie Martignon, Valérie Bergheaud, Samuel Buff, Victoria Chuat, Roland Cottin, Juliette Goussopoulos, Déborah Jarret, Michèle Tixier-Boichard, Florence Valence	
	Bonnes pratiques en valorisation de micro-organismes	183
	Angèle Charrier, Florence Valence-Bertel, Victoria Chuat, Stéphanie Mercier, Héroïse Simonson, Emmanuelle Helloin	
	La mise en œuvre des réglementations sur l'accès aux ressources génétiques et le partage des avantages (APA) dans les Centres de Ressources Biologiques membres de RARe	187
	Didier Bouchel	
	BioMICS : Un outil pour gérer les données associées aux collections des Centres de Ressources Biologiques	201
	Emmanuelle Artige, Cécile Grondin, Jonathan Mineau, Michel-Yves Mistou	
CONCLUSION	Quelles perspectives pour RARe en Europe et dans le monde ?	211
	Michèle Tixier-Boichard	

ÉDITO

Le concept de centres de ressources biologiques (CRB) a été proposé par l'OCDE en 2001, dans le but d'organiser l'accès aux ressources biologiques pour les recherches en biotechnologies. Ce concept a été repris en France par le Bureau des Ressources Génétiques qui a lancé un appel d'offres afin de faciliter l'organisation de la conservation des ressources génétiques par la mise en place de CRB. Cet appel d'offres a permis de consolider des initiatives préexistantes ou d'en soutenir de nouvelles. Dans la foulée, le GIS (Groupement d'intérêt scientifique) IBISA (Infrastructures en Biologie, Santé et Agronomie) a commencé à attribuer le label de CRB à des entités responsables de la gestion de ressources génétiques.

À ce stade, il est utile de préciser qu'une ressource biologique est constituée d'un matériel biologique et des données associées. Cette définition s'applique aux ressources à potentiel reproductif (banque de graines, de semence, plantules...) comme aux ressources génomiques destinées à la recherche (banques d'ADN, de tissus, de clones bactériens).

Les quatre missions canoniques d'un CRB sont la collecte, la caractérisation, la conservation et la distribution des ressources biologiques. Ces missions ne sont pas toutes effectuées avec la même intensité selon les CRB : tous conservent des ressources, ils peuvent les recevoir ou les avoir collectées, ils les caractérisent à des degrés variables, et en distribuent une proportion variable.

L'organisation des CRB pour la recherche a d'abord été organisée pour les ressources microbiennes, par la mise en place du Centre International de Ressources Microbiennes (CIRM), puis pour les ressources des animaux d'élevage avec le Projet Investissements d'Avenir « CRB-Anim ». En 2015, il est devenu évident que ces démarches valaient aussi pour les ressources végétales et pour les ressources biologiques, mobilisées par les sciences de l'environnement. L'infrastructure RARe pour « Ressources Agronomiques pour la recherche » est née de cette prise de conscience, en 2015, avec le soutien des organismes de recherche INRAE, CIRAD et IRD. Outre sa contribution importante à la préservation de la biodiversité, les objectifs scientifiques de RARe sont de :

- Développer des méthodes pour préserver le potentiel reproductif des ressources (cryobiologie) et caractériser des ressources nouvelles (microbiome, organoïdes).
- Rassembler ou produire des données sur les collections et faciliter leur (ré-)utilisation.
- Tirer profit des collections historiques ou récentes pour analyser la dynamique spatio-temporelle de la biodiversité, notamment à l'échelle infra-spécifique.
- Préserver, caractériser et fournir des échantillons de référence pour identifier des gènes contrôlant des phénotypes d'intérêt.

En 2016, RARe a été inscrite sur la feuille de route nationale des infrastructures de recherche. En 2017, le calcul des coûts complets des infrastructures a placé RARe parmi les plus importantes, avec un coût total d'environ 22 M€. En 2018, ce sont les ressources forestières qui ont rejoint l'infrastructure.

Les CRB de RARe doivent afficher des règles claires pour l'accès à leurs ressources, comme demandé dans la charte d'adhésion de RARe (<https://agrobrc-rare.org/Presentation/Qui-sommes-nous/Charte-d-adhesion-d-un-CRB>). Au 15 avril 2022, RARe compte 26 CRB adhérents ayant signé sa charte et environ une dizaine intéressés par l'adhésion. Chaque CRB dispose, en général, d'un comité d'utilisateurs. Sur le plan administratif, les CRB sont soit intégrés dans des unités de recherche (UR ou UMR) ou expérimentales, soit constituent des unités autonomes ; un seul CRB a un statut de GIS, en raison de son nombre élevé de partenaires (Cryobanque Nationale). En général, chaque CRB dispose d'un comité d'utilisateurs.

Les CRB sont regroupés en cinq piliers, définis soit par la nature biologique des ressources conservées, soit par la finalité des recherches auxquelles contribuent les ressources. Les piliers coordonnent les activités des CRB dans leur domaine. Le nombre de CRB par pilier varie de 4 à 16, à l'exception du pilier Forêt qui rassemble trois sites en un seul CRB. Les CRB qui ne seraient pas encore conformes à la charte constituent un 2^e cercle et sont invités aux activités des piliers et de RARe, afin de les aider à s'organiser pour adhérer à la charte. Les piliers ont chacun une gouvernance, souvent multitutelles, pour définir et superviser les actions communes à leurs CRB et développer un point unique d'accès au catalogue de leurs collections. Le partenariat économique est généralement spécifique à chaque pilier : cultures végétales, foresterie, élevage, procédés agro-alimentaires, biocontrôle, surveillance de l'environnement.

RARe développe des activités transversales pour stimuler les synergies entre ses piliers. Outre la coordination commune, avec un comité de pilotage et les représentants des tutelles ainsi que le conseil scientifique international multi-domaines, l'infrastructure a mis place des groupes transversaux : (SI) pour l'analyse des systèmes d'information et la mise en œuvre de la politique FAIR (*Findable, Accessible, Interoperable, Reusable*) des données, APA (accès et partage des avantages) pour l'appui juridique et la mise en œuvre de la réglementation du protocole de Nagoya, ECO pour l'élaboration du modèle économique de l'infrastructure, SMQ (Système de management de la qualité) pour le management de la qualité à tous les niveaux, et COM pour proposer et mettre en œuvre le plan de communication de RARe.

RARe se définit donc par des objectifs communs et un métier commun, celui de gestionnaire de ressources biologiques, pratiqué dans des contextes très divers. Ce numéro spécial a pour but de faire connaître les innovations et les différentes facettes de ce métier, à l'aide d'exemples choisis parmi les cinq piliers, pour illustrer les missions d'un CRB : collecte, caractérisation, conservation, distribution des ressources biologiques et leurs fonctions supports.

Michèle Tixier-Boichard

Directrice de recherche, INRAE

EDITORIAL

The concept of biological resource centres (BRC) was proposed by the OECD in 2001, in view to organising access to biological resources for research in biotechnology. This concept was taken up in France by the Bureau des Ressources Génétiques which launched a call for projects to facilitate the organisation of conserving genetic resources into BRCs. This call for projects resulted in consolidating initiatives that existed already and by supporting new ones. In parallel, the Scientific Interest Group (SIG) IBISA (Biology, Health and Agronomy Infrastructures) started to attribute the BRC label to entities responsible for managing genetic resources.

It appears useful, here, to point out that a biological resource combines a biological material with its associated data. This definition applies to resources with reproductive potential (seed banks, seedlings) and genomic resources intended for research (DNA banks, tissue banks, bacteria clones).

The four canonical missions of a BRC are the collection, characterisation, conservation and distribution of biological resources. These missions are not all carried out with the same intensity depending on the BRC: they all conserve resources, they can receive or collect them, they characterise them to various degrees, and distribute them in varying proportions.

BRCs for research were first organised for microbial resources, with the establishment of the International Microbial Resource Centre (IMRC), then for livestock breeding resources with the Investments for the Future Project "CRB-Anim". In 2015, it became clear that these approaches were also relevant for plant and for biological resources used in the environmental sciences. The AgroBRC/RARe infrastructure for "Agronomic Research Resources" emerged from this awareness in 2015, with the support of the research institutions INRAE, CIRAD and IRD. Besides its major contribution to the preservation of biodiversity, RARe's scientific objectives are to:

- Develop methods to preserve the reproductive potential of resources (cryobiology) and characterise new resources (microbiome, organoids).
- Collect and produce data on collections and facilitate their (re-)use.
- Take advantage of historic and recent collections to analyse the spatial-temporal dynamics of biodiversity, notably at the intra-specific scale.
- Preserve, characterise and supply reference samples to identify genes controlling phenotypes of interest.

In 2016, AgroBRC was registered in the french national roadmap for research infrastructures. In 2017, the calculation of the full costs of the infrastructure positioned AgroBRC among the most important, with a total cost of around €22 M. The infrastructure integrated forestry resources in 2018.

Rules for access to the resources of RARe's BRCs must be set out clearly, as required in the RARe's charter of membership (<https://agrobrc-rare.org/Presentation/Qui-sommes-nous/Charte-d-adhesion-d-un-CRB>). On 15 April 2022 AgroBRC counts 26 member BRCs having signed its charter

and more than a dozen interested in doing so. In general, each BRC has a user's committee. On the administrative level, the BRCs are integrated in research units (UR or UMR), experimental units, or constitute autonomous units. Only one BRC has the status of a SIG, due to its large number of partners (National Cryobank). In general, each BRC has a user's committee.

The BCRs are grouped into five divisions, defined either by the biological nature of the resources conserved, or by the objectives of the research to which the resources contribute. The divisions coordinate the activities of the BRCs in their domain. The number of BRCs per division varies from four to 16, with the exception of the Forestry division which groups three sites and a single BRC. The BRCs that do not yet comply with the charter make up a 2nd circle and are invited to participate in the activities of the divisions and of the AgroBRC, so that they can receive help to organise themselves to comply with the charter. Each of the divisions has its own governance, often with multiple entities, which defines and supervises the joint actions of their BRCs and defines a single point of access to the catalogue of their collections. Economic partnerships are generally specific to each division: crops, forestry, livestock, agri-food processes, biocontrol, environmental monitoring.

AgroBRC develops cross-disciplinary activities to stimulate synergies between its divisions. Besides common coordination, with a steering committee and representatives of the tutelar bodies and the multi-field international scientific committee, the infrastructure has set up cross-disciplinary groups: (SI) to analyse the information systems and implement the FAIR (Findable, Accessible, Interoperable, Reusable) policy for data, ABS (access and benefit sharing) for legal support and the implementation of the Nagoya protocol rules, ECO for building the infrastructure's business model, QMS (Quality Management System) for managing quality at all levels, and COM to propose and implement the AgroBRC's communication plan.

The AgroBRC infrastructure is therefore defined by common objectives and skills, for managing biological resources, practiced in very different contexts. The purpose of this special edition is to make known the innovations and different facets of this occupation, using examples chosen from the five divisions to illustrate the missions of a BRC: collection, characterisation, conservation, distribution of biological resources and their support functions.

Michèle Tixier-Boichard

Director of research, INRAE

Processus introduction, démarches et outils pour la gestion sanitaire des collections de fruits à noyaux du CRB *Prunus-Juglans*

Marine DELMAS¹
Jean LEONETTI²
Delphine RACOFIER¹
Marie-Laure GREIL¹
Frédéric GAUILLARD³
Alain BLANC³
Jean-Marc AUDERGON²

CORRESPONDANCE

marine.delmas@inrae.fr

jean-marc.audergon@inrae.fr

frederic.gauillard@inrae.fr

RÉSUMÉ

Les collections du CRB *Prunus-Juglans* d'INRAE conservent près de 2 800 accessions de fruitiers à noyaux (*Prunus*), en PACA et Nouvelle-Aquitaine. Ces espèces, multipliées essentiellement par voie végétative, sont particulièrement soumises aux risques sanitaires, notamment virus et bactéries. Pour protéger les collections et permettre leur valorisation, deux points de vigilance sont instruits, en relation avec les Services Régionaux pour l'Alimentation (SRAL), au plan réglementaire : l'introduction de matériel végétal sain et la surveillance des collections. Le règlement sanitaire européen, avec son passeport phytosanitaire, ainsi que le système de certification fruitière sont deux éléments clés de ces processus. Ils permettent l'introduction du matériel le plus sûr possible et la protection durable des ressources en collection. En fonction des risques, des mesures d'isolement, de contrôle et de prévention sont décidées et appliquées par les agents du CRB.

MOTS-CLÉS

Introduction, *Prunus*, Collection, Risque Sanitaire, Quarantaine.

1 INRAE, UE 393 Unité Expérimentale Arboricole (UEA), F-47320 Bourran, France.

2 INRAE, UR 1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (GAFL), F-84143 Montfavet, France.

3 INRAE, UE 1495 Unité Expérimentale Avignon Horticulture Méditerranéen (AHM), F-84914 Avignon, France.

Introduction process, approaches and tools for managing the health of stone fruits of the BRC *Prunus-Juglans*

Marine DELMAS¹
Jean LEONETTI²
Delphine RACOFIER¹
Marie-Laure GREIL¹
Frédéric GAUILLARD³
Alain BLANC³
Jean-Marc AUDERGON²

CORRESPONDENCE

marine.delmas@inrae.fr

jean-marc.audergon@inrae.fr

frederic.gauillard@inrae.fr

ABSTRACT

The collections of the BRC *Prunus-Juglans* of INRAE conserve around 2,800 accessions of stone fruits (*Prunus*), in the PACA and Nouvelle-Aquitaine regions of France. These species, mostly obtained through vegetative propagation, are particularly vulnerable to health risks, notably viruses and bacteria. To protect the collections and permit their exploitation, two points of vigilance are ensured with the SRAL on the regulatory level: the introduction of healthy plant material, and monitoring the collections. European health regulations and phytosanitary passport, and the fruit tree certification system, are two key elements of this process. They ensure that the material introduced is as safe as possible, and the sustainable protection of the resources in the collection. Depending on the risks, isolation, control and prevention measures are decided and taken by the employees of the BRC.

KEYWORDS

Introduction, *Prunus*, collection, health risk, quarantine.

1 INRAE, UE 393 Unité Expérimentale Arboricole (UEA), F-47320 Bourran, France.

2 INRAE, UR 1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (GAFL), F-84143 Montfavet, France.

3 INRAE, UE 1495 Unité Expérimentale Avignon Horticulture Méditerranéen (AHM), F-84914 Avignon, France.

Les collections *Prunus* d'INRAE en quelques mots et quelques chiffres

Le CRB *Prunus-Juglans* abrite des collections d'espèces fruitières et apparentées appartenant aux genres *Prunus* (fruitiers à noyaux) et *Juglans* (noyers), en verger ou en pot sous abris protégés des insectes. Les collections *Prunus* sont réparties sur 4 sites en Nouvelle-Aquitaine et PACA, et gérées par trois unités INRAE (UR GAFL⁴, UE AHM⁵, UEA⁶). Elles sont riches de 2 800 accessions appartenant à 42 espèces (Figure 1) et servent de support à plusieurs programmes de recherches et d'innovation variétale d'INRAE, notamment dans une dynamique d'adaptation aux stress biotique et abiotique auxquels la filière fruitière est confrontée. Dans ce cadre, il est primordial de garantir la qualité sanitaire des ressources diffusées. Pour exemple, en moyenne 750 échantillons par an sont diffusés depuis les collections aquitaines, essentiellement vers des équipes de recherches, mais aussi vers des professionnels et des amateurs. Et ce sont près d'une dizaine de nouvelles accessions qui entrent chaque année, de France ou de l'étranger, pour enrichir les collections, ainsi que 500 à 1 000 porte-greffes issus de la filière de certification pour le renouvellement du matériel végétal ou pour des expérimentations spécifiques.

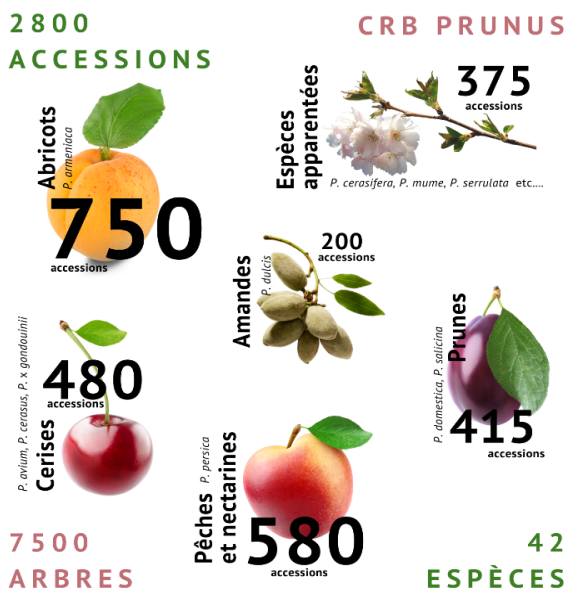


Figure 1. Le CRB *Prunus* en chiffres

Introduire du matériel sain : une nécessité pour les collections et les filières

Le genre *Prunus* (*Rosaceae*) comprend plus de 230 espèces, dont certaines très répandues et échangées, à travers le monde, comme cultures fruitières ou ornementales. Elles sont affectées par un très grand nombre de virus, viroïdes et bactéries (Figure 2), disséminés essentiellement lors des opérations de multiplication végétative comme le greffage (Rubio *et al.*, 2017).

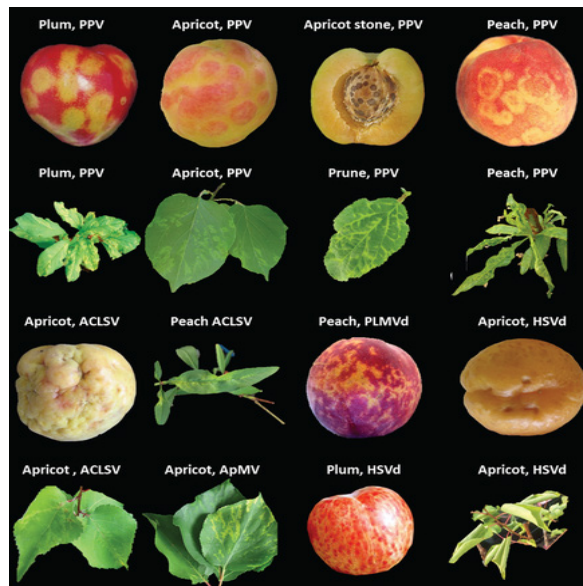


Figure 2. Quelques symptômes pathologiques sur feuilles et fruits (Rubio *et al.*, 2017)

Ces organismes pathogènes peuvent être également disséminés par des vecteurs (insectes, acariens ou nématodes) ; c'est le cas du virus de la Sharka (Plum Pox Virus), transmis par pucerons et dont le coût mondial a été estimé à plus de 10 milliards d'euros en 30 ans (Cambra *et al.*, 2006), ou encore de la « bactérie tueuse » *Xylella fastidiosa* transmise par des cicadelles. Ces différents agents pathogènes, seuls ou en combinaison, ont des conséquences pouvant affecter la croissance, voire la survie, des arbres (PPV, *X. fastidiosa*, l'Enroulement Chlorotique de l'Abricotier -ECA), ou modifier certains caractères pomologiques des variétés, et donc la description de ces arbres ; par exemple, le Little Cherry Virus 2 (LChV2), entraîne, comme son nom l'indique, la formation de cerises plus petites. Il est crucial de contrôler les agents pathogènes les plus néfastes en prêtant attention aux possibilités de transmission, vecteurs, pluie, pollen, taille ou greffage, afin de se prémunir de leur diffusion au sein des vergers conservatoires. Protéger les collections

4 Unité de Recherche Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (Montfavet).
5 Unité Expérimentale Avignon Horticulture Méditerranéenne (Avignon).
6 Unité Expérimentale Arboricole (Bourran).

repose sur deux piliers indissociables : l'introduction de matériels sains et le suivi des plants en place pour s'assurer qu'ils demeurent en bon état sanitaire.

Réglementation et certification : deux outils facilitant le contrôle des introductions

L'introduction de matériel sain et le maintien des collections sont d'une importance majeure pour les filières fruitières et ornementales. Leur gestion s'appuie sur le cadre réglementaire mis en place afin de minimiser les risques sanitaires pour les usagers : le Règlement de Santé des Végétaux (RSV) et les directives de commercialisation, notamment la démarche de certification.

Le règlement européen sur la santé des végétaux

Avec la mondialisation des échanges et la prise de conscience de l'importance de la santé des plantes pour l'agriculture et l'économie mondiales, mais aussi pour la préservation de l'environnement, la régulation des échanges de matériel végétal a pris de plus en plus de poids dans la politique de l'Union Européenne (UE). Des réglementations ont successivement été mises en place : la directive 2000/29/CE, aujourd'hui abrogée et remplacée par le règlement 2016/2031 applicable dans tous les pays de l'UE (Montanari et Traon, 2017). Ce règlement a pour objectif de protéger le territoire européen face à l'introduction et à la dissémination d'organismes nuisibles aux végétaux. Il s'appuie sur deux éléments essentiels : 1) la catégorisation des organismes nuisibles en fonction du risque lié à leur circulation au sein de l'UE (Figure 3) ; 2) l'apposition d'un passeport phytosanitaire (Figure 4) à l'ensemble des végétaux destinés à la plantation ou à la multiplication, entre opérateurs professionnels⁷ au sein de l'UE, y compris au sein d'un même pays. Ainsi, **tout le matériel entrant dans les collections du CRB doit disposer d'un passeport phytosanitaire** (ou d'un certificat phytosanitaire dans le cas d'une

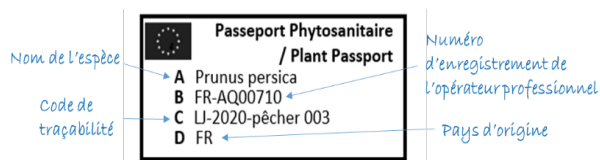


Figure 3. Exemple de passeport phytosanitaire : expédition de greffons de pêchers depuis les collections *Prunus* de Gironde (33)

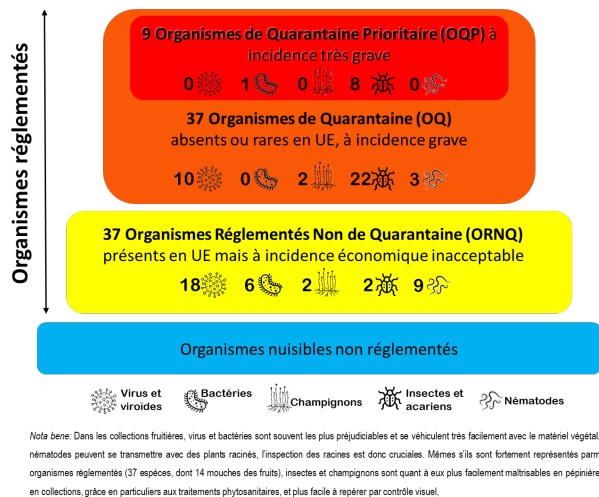


Figure 4. Classifications des organismes nuisibles pour le genre *Prunus* réalisé d'après l'analyse du Règlement d'exécution UE 2019/2072 et du Règlement UE 2019/1702 (2021)

provenance hors UE). Il est donc, en principe, exempt de tous les organismes réglementés pour les *Prunus*, soit plus de 80 organismes identifiés. Parmi eux, 31 virus et viroïdes ainsi que 7 bactéries pathogènes pour lesquels il n'existe pas de traitements curatifs autorisés ou efficaces. Citons à nouveau la bactérie *Xylella fastidiosa*, classée Organisme de Quarantaine Prioritaire (OQP), ou le virus de la Sharka, classé Organisme Réglementé Non de Quarantaine (ORNQ).

La serre d'introduction *Prunus* d'INRAE

Il est parfois nécessaire d'introduire en collection du matériel sans passeport phytosanitaire, par exemple du matériel issu de prospections, ou encore pour protéger une variété implantée dans un environnement contaminé. Dans ce cas, il est obligatoire de passer par une **structure de quarantaine** agréée. Le matériel végétal y est conservé jusqu'à ce que les preuves de conformité aux exigences communautaires soient obtenues. C'est l'unité de Quarantaine de l'ANSES, située Clermont-Ferrand⁸, qui assure cette prestation pour les espèces fruitières en France. Au sein



Figure 5. La serre d'introduction *Prunus*, INRAE, UR 1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, F-84143 Montfavet, France

⁷ Notamment les obtenteurs, pépiniéristes, jardinerie, mais aussi les CRB.

⁸ Unité de Quarantaine, Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). Laboratoire de la santé des végétaux, F-63370 Lempdes.

d'INRAE, l'UR GAFL s'est dotée d'une serre de quarantaine agréée par le SRAL⁹ (Figure 5). Après introduction et greffage sur des porte-greffe issus de la certification, les plants introduits sont suivis pendant deux cycles de végétation complets : observations visuelles, test ELISA¹⁰, en interne et en prestation, indexage biologique¹¹. En cas de détection d'un organisme réglementé, les plants sont détruits. Dans le cas contraire, ils bénéficient d'une main levée par le SRAL et peuvent intégrer les collections, munis d'un passeport phytosanitaire.

La certification fruitière : authenticité variétale et garanties sanitaires

Le système de certification française est un des plus anciens du monde. Il s'est mis en place au début des années 50 pour encourager la multiplication de certains cultivars de pêchers et pruniers, dans un souci de maîtrise d'authenticité variétale. Dans les années 60, au fur et à mesure des avancées en phytopathologie, les problématiques sa-

nitaires ont été intégrées (Bernhard, 1986). Le CTIFL¹² est la cheville ouvrière de ce processus ; à cet effet, il conserve des plants dits initiaux, sains et authentifiés, sous insect proof, et en distribue des greffons aux quelques 70 pépiniéristes adhérant au dispositif (Ten Have-Lopez, 2020). Cette certification apporte une garantie sanitaire supplémentaire à celle du passeport phytosanitaire : par exemple, des tests sanitaires systématiques sont réalisés pour le suivi des organismes règlementés non de quarantaine, comme les virus de l'ACLSV ou du PNRSV, parasites dits de qualité qui pourraient altérer le phénotype des variétés (couleur, date de maturité, productivité notamment). Des contrôles de filiation assurent, quant à eux, l'authenticité variétale des variétés cultivées inscrites au catalogue européen. Les 500 à 1 000 porte-greffes introduits chaque année, par le CRB, pour dupliquer les matériels d'intérêt sont issus de cette filière de production. Par contre, une grande partie de nos ressources génétiques sont par définition exclues de ce dispositif ; aussi, des points de vigilance supplémentaires sont-ils mis en place.

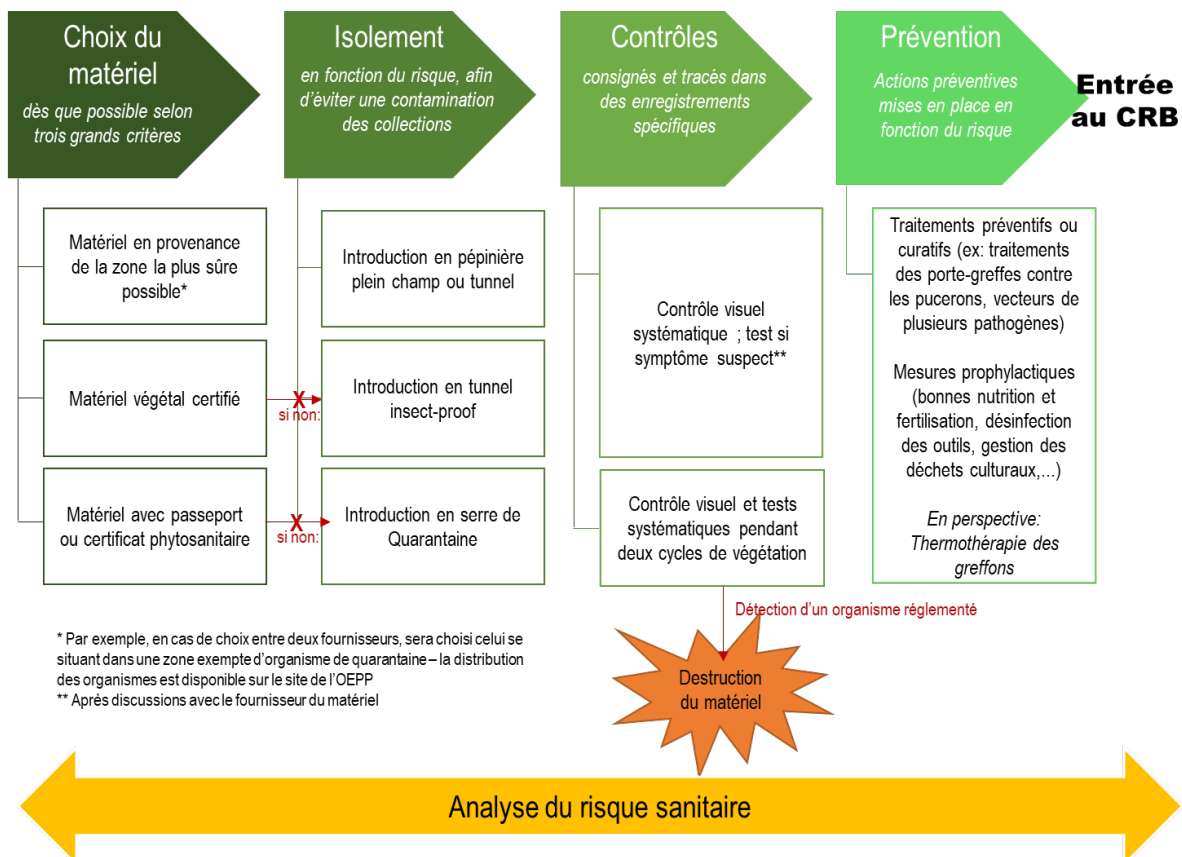


Figure 6. Gestion du risque sanitaire lors des introductions de matériel végétal dans les collections *Prunus* d'INRAE

9 Service Régional pour l'Alimentation.

10 ELISA : Technique d'immuno-absorption par enzyme liée.

11 Technique permettant de détecter un pathogène par inoculation à une plante indicatrice sensible. Sur *Prunus*, elle passe en général par un greffage sur porte-greffe sensible (GF 305).

12 Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes.

Le processus global d'introduction du CRB vis-à-vis du risque sanitaire

À chaque étape du processus, une analyse de risque est conduite. Son objectif général est d'éviter toute contamination des collections pouvant entraîner leur mise en péril. Comme indiqué dans la figure 6, la première étape est de privilégier bien sûr le matériel le plus sain possible. En fonction du risque pris, des mesures d'isolement, de contrôles et de prévention plus ou moins renforcées sont prises. Les agents du CRB sont ainsi formés à contrôler le matériel entrant, et un responsable sanitaire des collections a été nommé dans chaque région.

Le risque sanitaire pesant sur les collections étant croissant, d'autres procédures sanitaires sont mises en place dans le CRB, comme les prospections et contrôles en verger et pépinières ou, *a minima*, pour les matériels les plus précieux, la mise en place de doublons de sécurité. Des recherches visant à améliorer ce processus d'introduction sont également menées : ainsi, le CTIFL et INRAE (dont le CRB *Prunus-Juglans*) travaillent actuellement à la mise au point et à l'évaluation d'une méthode d'assainissement de greffons par bain d'eau chaude, ou thérapie (Brans, 2019). Ceci permettrait, par exemple, de traiter préventivement des greffons introduits, mais aussi les greffons en sortie des collections, afin de protéger encore plus efficacement notre patrimoine fruitier... *À suivre...* ■

Références

Bernhard R., 1986. Certification des arbres fruitiers. Bulletin OEPP 16 : 245-253.

Brans Y., 2019. Traitement à l'eau chaude pour l'assainissement du matériel fruitier - Le projet ThermoFruit évalue la faisabilité. Infos ctifl 357 : 28-33.

Cambra M., Capote N., Myrta, A. and Llácer, G., 2006. Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. EPPO Bulletin 36 : 202- 204.

Montanari F. and Traon D., 2017. Modernising EU Policy against Phytosanitary Risks – The new EU Plant Health Law. European Food and Feed Law Review 12 : 131-141.

Rubio M., Martínez-Gómez P., Marais A., Sánchez-Navarro J.A., Pallás V. and Candresse T., 2017. Recent advances and prospects in *Prunus* virology. Ann Appl Biol 171 : 125-138.

Ten Have-Lopez S., 2020. Certification fruitière : accompagner les professionnels à la mise en place de la nouvelle réglementation. Infos ctifl 367 : 6-7.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Collecte d'échantillons au Centre de Ressources Biologiques Colisa (*collection of ichthyological samples*)

Frédéric MARCHAND¹
Agnès STARCK¹
Frédéric LANGE²

CORRESPONDANCE

frederic.marchand@inrae.fr

RÉSUMÉ

La gestion des populations de poissons migrateurs à des fins de restauration ou de conservation nécessite d'en connaître la dynamique spatiale et temporelle. L'âge, la croissance, l'origine géographique, par exemple, sont des éléments importants à suivre pour mieux comprendre cette dynamique. Pour cela, des prélèvements de tissus sur les poissons sont réalisés lors de leur capture, soit par les pêcheurs amateurs soit par des professionnels, sur des observatoires ou des programmes dédiés à ces populations.

L'objectif de cet article est de décrire les pratiques de l'Observatoire de Recherche en Environnement sur les poissons diadromes dans les fleuves côtiers (ORE DiaPFC) et de fournir des éléments pour réaliser la collecte d'échantillons de différents tissus de poissons.

MOTS-CLÉS

Collection, poisson, écaille, otolithe, opercule, âge, croissance, génétique, microchimie.

¹ INRAE, pôle OFB-INRAE-L'Institut Agro-UPPA pour la gestion des migrateurs amphihalins dans leurs environnements, U3E, F-35042, Rennes, France.

² INRAE, pôle OFB-INRAE-Agrocampus Ouest-UPPA pour la gestion des migrateurs amphihalins dans leurs environnements, ECOBIOP, F-64310, Saint-Pée-Sur-Nivelle, France.

Sample collection at the Colisa Biological Resource Center (collection of ichthyological samples)

Frédéric MARCHAND¹
Agnès STARCK¹
Frédéric LANGE²

CORRESPONDENCE

frederic.marchand@inrae.fr

ABSTRACT

The management of migrating fish populations for the purposes of restoration and conservation requires knowledge of spatial and temporal dynamics. Age, growth and geographical origin, for example, are important items to monitor to better understand these dynamics. To achieve this, samples of tissue are taken from fish after their capture, either by amateur anglers or by professionals, at observatories or in the framework of programs dedicated to these populations.

The objective of this article is to describe the practices of the Environmental Research Observatory regarding diadromous fish in coastal rivers (ORE Dia-PFC) and provide elements to carry out the collection of samples from different fish tissues.

KEYWORDS

Collection, fish, scale, otolith, operculum, age, growth, genetic, microchemistry.

¹ INRAE, pôle OFB-INRAE-L'Institut Agro-UPPA pour la gestion des migrateurs amphihalins dans leurs environnements, U3E, F-35042, Rennes, France.

² INRAE, pôle OFB-INRAE-Agrocampus Ouest-UPPA pour la gestion des migrateurs amphihalins dans leurs environnements, ECOBIOP, F-64310, Saint-Pée-Sur-Nivelle, France.

Introduction

La collecte d'échantillons de tissus sur les poissons est depuis longtemps réalisée dans le cadre de programmes de recherches ou d'observatoires (Azam, 2020). Ces échantillons donnent accès à un grand nombre d'informations, sur le poisson ou l'environnement qu'il fréquente, grâce à diverses méthodes : étude structurale, chimique, génétique, etc. Au plan scientifique, ils contribuent à la caractérisation actuelle et rétrospective des individus ou des populations de poissons, au regard des traits d'histoire de vie, de l'évolution de la diversité génétique de ces populations et des modifications des conditions environnementales dans lesquelles elles évoluent. Au plan opérationnel, ils participent à la définition des opérations de protection, de gestion des populations exploitées : définition de quotas, périodes d'ouverture de pêche, etc.

Nos échantillons intègrent un Centre de Ressources Biologiques multisites, COLISA (<https://doi.org/10.15454/D30DJM>) qui en assure la caractérisation, la conservation et la diffusion. COLISA se caractérise par son envergure historique (depuis 1958), ainsi que par la nature de ses échantillons (écailles otolithes, divers tissus ...), leur quantité (+ de 330 000 actuellement) et leur origine géographique (Métropole et îles Kerguelen). Il résulte de la fusion d'échantillons historiques et récents collectés par l'U3E (<https://doi.org/10.15454/1.5573930653786494E12>) et l'UMR ESE à Rennes, l'UMR ECOBIOP à Saint-Pée-sur-Nivelle (<https://doi.org/10.15454/1.5572402068944548E12>), l'UMR CARRTEL à Thonon les Bains (SOERE OLA) et le Pôle OFB-INRAE-Institut Agro-UPPA pour la gestion des migrateurs amphihalins dans leur environnement.

COLISA fait partie du pilier environnement, BRC4Env (<https://doi.org/10.15454/TRBJTB>), un des piliers constitutifs de l'Infrastructure nationale de Recherche (IR) « Ressources Agronomiques pour la Recherche » (AgroBRC-RARE). Le CRB Colisa est également inclus dans l'IR LIFE, infrastructure de recherche INRAE centrée sur « l'écologie des organismes aquatiques » dans les milieux aquatiques continentaux.

Historiquement, les échantillons étaient prélevés avec un objectif précis, et souvent unique, et le mode opératoire ne prenait pas en compte d'éventuelles autres utilisations futures. L'objectif de la collecte actuelle, présentée dans cet article, est d'offrir toutes les précautions nécessaires afin de multiplier les utilisations possibles des échantillons, en portant une attention particulière aux métadonnées associées.

Les principaux types d'échantillons et leurs usages

En fonction des programmes de recherche, différents types d'échantillons sont prélevés sur les poissons.

Écailles

Les écailles (Figure 1) constituent une grande partie de la collection du CRB COLISA de par la simplicité de leur conservation, de leur stockage (dans une enveloppe en milieu sec) et la facilité de leur échantillonnage. Les écailles présentent l'avantage de pouvoir être collectées sur un poisson vivant. Elles sont utilisées pour déterminer l'âge et la croissance ainsi que pour des analyses génétiques ou microchimiques (Marchand, 2006).



Figure 1. Écaille de saumon atlantique (Photo : F. Marchand)

Otolithes

Les poissons possèdent une oreille interne qui contient de petites structures calcaires appelées otolithes (Figure 2). Leur coupe



Figure 2. Otolithes de truite fario (Photo : J-C. Aymes)

produit une image similaire à celle des stries de croissance d'une coupe d'arbres ou de l'écaille et permet de retracer l'histoire de vie du poisson. Avec un grossissement adapté, on peut observer les stries journalières. Elles sont obligatoirement prélevées sur poisson mort et utilisées pour déterminer l'âge, la croissance et pour des analyses microchimiques.

Nageoires

Les nageoires sont porteuses d'ADN de meilleure qualité que celui présent sur les écailles et permettent de mieux caractériser génétiquement les individus ou les populations. Une biopsie d'une très petite partie de la nageoire (moins de 0,25 cm²) permet de relâcher ensuite le poisson.

La collecte sur le terrain

Avant toute collecte d'échantillons, il est indispensable de vérifier les autorisations nécessaires. Ainsi, la capture du poisson dans le milieu naturel pour lui prélever des tissus est soumise à autorisation lorsque la capture n'est pas réalisée par un tiers (pêcheurs à la ligne ou professionnel). Une demande, généralement annuelle, doit être faite à la préfecture (DDTM) qui délivre alors un arrêté autorisant la capture des poissons. Un bilan de ces captures doit être envoyé, sous un à deux mois selon les préfectures, ainsi qu'un bilan annuel en fin d'année. La collecte à des fins de mise en collection n'est pas soumise à la réglementation sur l'accès aux ressources génétiques et le partage des avantages (APA), seule l'utilisation qui sera faite des échantillons l'est. Le prélèvement sur des poissons vivants destinés à retourner à l'eau nécessite de les endormir dans la plupart des cas. Le protocole doit alors être soumis à un comité d'éthique animale.

Quelle que soit la méthode de collecte et le type d'échantillon, il faut préparer en amont les conditionnements nécessaires aux prélèvements. Ces supports sont identifiés de manière unique. Le protocole définit comment, combien et quand réaliser les prélèvements. Dans le cadre de l'observatoire DiaPFC, l'échantillonnage est réalisé en fonction de l'espèce, du stade de l'individu, de son lieu de capture et de sa taille. Il est nécessaire de nettoyer les instruments de collecte entre deux poissons et, lorsque cela est possible, d'éliminer toute pollution génétique du poisson précédent en les trempant dans une solution de javel, puis d'alcool à 90 °C, puis rincés à l'eau distillée.

Prélèvements sur poissons vivants

Pour assurer le bien-être et la sécurité du poisson vivant, il doit être endormi dans un bain contenant une solution anesthésiante (benzocaïne, clou de girofle ...).

Écailles

Les zones de prélèvement (Figure 3) sont dépendantes de l'espèce (Baglinière, 2020). Elles correspondent généralement à

l'endroit où apparaissent les premières écailles ou dans des zones où la perte d'écailles au cours de la vie du poisson est moindre. Les écailles de remplacement, appelées écailles régénérées, n'intègrent plus l'histoire de vie du poisson avant ce remplacement. Elles ne doivent pas non plus être prélevées sur la ligne latérale, car elles sont perforées par le canal sensoriel latéral (ligne latérale), ce qui réduit la lisibilité.

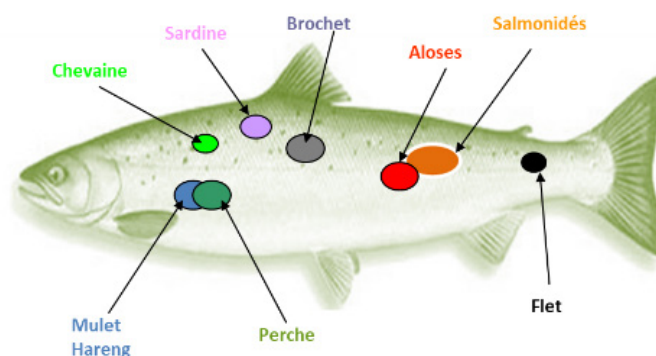


Figure 3. Localisation du prélèvement sur le poisson (adapté de Ombredane et Baglinière, 1992)

Le nombre d'écailles prélevées dépend du protocole expérimental, mais il est recommandé de prélever entre 10 à 15 écailles sur un poisson vivant (plus sur un poisson mort) pour éviter de n'avoir que des régénérées, 60 % dans le cas de la truite de mer (Baglinière et al., 1986). Elles sont prélevées soit en raclant le derme avec un scalpel (ou couteau) peu aiguisé soit à l'aide d'une pince. Cette dernière est souvent utilisée sur les gros poissons. Les écailles prélevées sont insérées dans une pochette bulle ou cristal où sont reportées les informations d'identification.

Biopsie de nageoire

Il faut nettoyer les pinces et les ciseaux en les plongeant successivement dans l'eau de javel, l'alcool à 90 °C, puis les rincer à l'eau distillée, bien les essuyer avec le papier absorbant. Maintenir la nageoire du poisson avec la pince et en découper un petit morceau (x mm²) et déposer le morceau avec la pince dans un microtube de 1,5 ml préalablement étiqueté et rempli d'éthanol à 99,9 %.

Prélèvements sur poissons morts

Otolithe

Les poissons sont ramenés au laboratoire (entiers ou uniquement la tête) pour réaliser l'extraction des otolithes. Sur les gros individus, elle peut être réalisée sur le terrain. Des pinces en téflon ou plastique sont nécessaires pour ne pas polluer l'échantillon avec des minéraux.

Sciences participatives

Dans certains cas, afin d'augmenter l'échantillonnage, il est fait

appel à la société civile dans le cadre des Sciences participatives. Dans ce cas, nous fournissons les modes opératoires (Figure 4) et le matériel pour réaliser ces prélèvements.

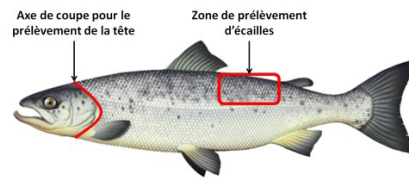
Entrée en collection

Les échantillons collectés sont ensuite intégrés dans la collection. Afin de sécuriser le stockage, les écailles prélevées sur un poisson sont réparties en deux sous-échantillons stockés dans deux bâtiments différents.

Les données et métadonnées décrivant l'échantillon sont intégrées en base de données où elles subissent un certain nombre de vérifications. Une fois validées, elle sont insérées dans le catalogue de COLISA (<https://colisa.fr/>) et les échantillons deviennent accessibles à la communauté scientifique. ■

INRAE- U3E Protocole de conditionnement des échantillons de saumons reproducteurs :

1. Prélever la tête, en conservant la boîte crânienne intacte. Les têtes crues sont préférables, mais les cuites sont également acceptées.
2. Déposer dans le sachet en papier une dizaine d'écailles prélevées en arrière de la nageoire dorsale et au-dessus de la ligne latérale.
3. Si le saumon est une femelle, il est possible de prélever les ovaires contenant les œufs.
4. Renseigner les informations demandées au dos de ce coupon.
5. Conserver la tête et les ovaires dans un sac plastique au congélateur, avec le sachet d'écaille fourni et ce coupon.



Utilité des prélèvements :

- La tête contient des concrétions calcifiées, les otolithes qui permettent de déterminer l'origine géographique du saumon.
- Les écailles permettent de déterminer l'âge du poisson et de reconstituer son histoire.
- Les ovaires permettent d'établir une corrélation entre la taille du saumon et le nombre d'œufs déposés.

Informations à renseigner (merci d'écrire en majuscules) :

Date de capture : Numéro de la bague :

Lieu de capture : Rivière :

Commune :

Lieu-dit :

Longueur totale du saumon : cm Poids : g

Sexe, si déterminé avec certitude :

Merci de votre participation.



Unité Expérimentale d'Ecologie et d'Ecotoxicologie aquatique
63, rue de St Brieuc CS 84 215 / 35042 Rennes Cedex
☎ : 02-23-48-54-41 Fax : 02-23-48-54-40

Figure 4. Mode opératoire de prélèvement fourni aux pêcheurs de saumons

Références

Azam, D., Basílico L., Beaulaton L., Marchand F. et Prévost E., 2020. Trois décennies d'observations et de recherche sur les poissons migrateurs. Comprendre pour agir. OFB ; 2020.

Baglinière J.-L., Leclerc C. et Richard A., 1986. Comparaison entre l'âge et la croissance déterminés par scalimétrie et otolimétrie chez la truite de mer (*Salmo trutta*). Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, 301, 56-66.

Baglinière J.-L., Hamelet V., Guéraud, F., Aymes J.-C., Goulon C., Richard A., Josset Q. et Marchand F., 2020. Guide Pour l'interprétation des écailles et l'estimation de l'âge chez la Truite Commune (*Salmo Trutta*) dans les populations françaises. Office français de la biodiversité (OFB). Guides et protocoles ; 2020.

Marchand F., Tremblay J., Jeannot N. et Azam D., 2006. Exemples d'utilisation des écailles en écologie ; Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques. P. 75-78.

Ombredane D. et Baglinière J.-L. 1992. Les écailles et leurs utilisations en écologie halieutique. In : Baglinière J.L. (ed.), Castanet J. (ed.), Conand François (ed.), Meunier F.J. (ed.). *Tissus durs et âge individuel des vertébrés*. Paris : ORSTOM ; INRA, p. 151-192. (Colloques et Séminaires). Colloque National, Bondy (FRA), 1991/03/4-6. ISBN 2-7099-1071-3 (ORSTOM). ISSN 0767-2896.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Projet BrasExplor : élargir les ressources génétiques du CRB BrACySol pour *Brassica oleracea* et *Brassica rapa*

Cyril FALENTIN¹

Vincent RICHER²

Pascal GLORY¹

Gwenaëlle DENIOT¹

Julie FERREIRA DE CARVALHO¹

Claudia BARTOLI-KAUTSKY¹

Anne-Yvonne GUILLERM-ERCKELBOUDT¹

Sylvain THÉRÉNÉ²

Stéphane DORÉ²

Marie GILET¹

Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN¹

Laurène GAY³

Anne-Marie CHÈVRE¹

CORRESPONDANCE

anne-marie.chevre@inrae.fr

RÉSUMÉ

Plusieurs espèces de *Brassica* sont conservées au sein du Centre de Ressources Biologique BrACySol à Ploudaniel (<https://www6.rennes.inrae.fr/igepp/L-IGEPP/Plateformes/BrACySol>). Pour le chou (*Brassica oleracea*, CC, 2n=18) et le navet (*Brassica rapa*, AA, 2n=20), les ressources comprennent essentiellement des populations fermières collectées dans les années 1980. Ces deux espèces existent cependant sous forme de populations sauvages ou férales sur l'ensemble du territoire français, et leurs collectes s'avèrent indispensables pour élargir les ressources disponibles. Dans le cadre du projet H2020 Prima BrasExplor comprenant 11 partenaires de six pays, nous proposons de collecter environ 100 populations sauvages et fermières de chacune de ces deux espèces, sur un gradient nord de la France jusqu'à la zone subsaharienne d'Afrique du Nord. Ce matériel offre une opportunité très originale (i) d'identifier les déterminants génétiques responsables de l'adaptation aux contraintes climatiques, et (ii) de valoriser des populations fermières. Nous présentons ici la méthodologie suivie, les collectes en cours sur le territoire français et les travaux qui seront engagés dans le cadre du projet BrasExplor. Ces travaux ouvrent des perspectives d'amélioration vis-à-vis des contraintes abiotiques et biotiques chez le chou, le navet, ou encore le colza (*Brassica napus*, AACC, 2n=38) issu de l'hybridation naturelle entre ces deux espèces diploïdes.

MOTS-CLÉS

Choux, navets, navettes, diversité, contraintes climatiques, contrôle génétique.

* Premiers auteurs

1 IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, 35653, Le Rheu, France.

2 IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, 29260, Ploudaniel, France.

3 AGAP, CIRAD, INRAE, SupAgro, Univ. Montpellier, 34060 Montpellier, France.

BrasExplor project: widening the *Brassica oleracea* and *Brassica rapa* genetic resources available in the Biological Resource Center BrACySol

Cyril FALENTIN^{*1}

Vincent RICHER^{*2}

Pascal GLORY¹

Gwenaëlle DENIOT¹

Julie FERREIRA DE CARVALHO¹

Claudia BARTOLI-KAUTSKY¹

Anne-Yvonne GUILLERM-ERCKELBOUDT¹

Sylvain THÉRÉNÉ²

Stéphane DORÉ²

Marie GILET¹

Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN¹

Laurène GAY³

Anne-Marie CHÈVRE¹

CORRESPONDENCE

anne-marie.chevre@inrae.fr

ABSTRACT

Several *Brassica* species are conserved in the Biological Resource Center BrACySol at Ploudaniel (<https://www6.rennes.inrae.fr/igepp/L-IGEPP/Plate-formes/BrACySol>). For *Brassica oleracea* (CC, 2n=18) with different cultigroups (cabbage, cauliflower, Brussel sprout, kale) and *Brassica rapa* (AA, 2n=20; turnip and forage), available biological resources are derived from landraces collected in small farms during the 1980s. However, both species are present in France as wild or feral populations and their conservation is essential to widen the available resources. Within the framework of the H2020 Prima BrasExplor project, which includes 11 partners from six countries, we are currently collecting 100 wild populations and landraces for each species over a large climatic gradient, ranging from the north of France to sub-Saharan regions of North Africa. This plant material offers a unique opportunity to (i) identify the genetic determinants of adaptation to climatic constraints, and (ii) promote local landraces. In this article, we present the methodology used, the sampling efforts in progress in France, and the research questions that will be investigated in the BrasExplor project. This study will open new avenues in plant breeding programs, especially for the creation of new varieties adapted to abiotic and biotic stresses in both *B. oleracea* and *B. rapa*, as well as in their derived allotetraploid species, oilseed rape (*Brassica napus*, AACC, 2n=38).

KEYWORDS

Cabbages, cauliflower, Brussels sprouts, kales, turnip, forage, genetic determinants of climatic constraints.

* First co-authors

1 IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, 35653, Le Rheu, France.

2 IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, 29260, Ploudaniel, France.

3 AGAP, CIRAD, INRAE, SupAgro, Univ. Montpellier, 34060 Montpellier, France.

Introduction

Le genre *Brassica* présente un exemple remarquable pour illustrer la polyploïdie (génomés nucléaires dupliqués au sein de la même cellule) aussi bien dans son histoire ancienne que récente. En effet, les trois espèces diploïdes, le chou (*Brassica oleracea*, CC, $2n=18$), la navette-le navet (*Brassica rapa*, $2n=20$) et la moutarde noire (*Brassica nigra*, BB, $2n=16$) sont issues d'un ancêtre commun qui a connu une triplification de son génome (~20Ma). Depuis cet événement, les génomes de *Brassica* se sont diploïdisés et ont perdu certaines copies dupliquées par un processus dit de fractionnement. Néanmoins, il est toujours possible de retrouver au sein de chaque génome (A, B et C) des traces de ces blocs tripliqués (Murat *et al.*, 2015). Plus récemment (~7500 ans), ces espèces diploïdes se sont à leur tour hybridées pour donner naissance à trois espèces allopolyploïdes, le colza (*B. napus*, AACC, $2n=38$) issu de l'hybridation de la navette et du chou, la moutarde brune ou condimentaire (*B. juncea*, AABB, $2n=36$) issue de l'hybridation de la navette et de la moutarde noire, et la moutarde d'Abyssinie (*B. carinata*, BBCC, $2n=34$) issue de l'hybridation de la moutarde noire et du chou. Les relations entre ces espèces ont été illustrées sous forme d'un triangle par Nagaharu (1935). Il est encore possible à partir des espèces diploïdes contemporaines de reproduire, par croisements, les espèces allopolyploïdes.

Ces espèces sont très consommées dans le monde entier et présentent un intérêt économique majeur comme légumes racines, feuilles ou fleurs pour les choux et les navets, comme condiment pour la moutarde brune, comme fourrages pour les choux, les navettes ou le colza, ou comme espèces oléagineuses pour la navette ou le colza. Ce dernier est la seconde espèce oléagineuse dans le monde.

Le chou et la navette ayant une origine eurasienne et étant présents actuellement dans le pourtour du Bassin Méditerranéen, il apparaît crucial de répertorier et de conserver les formes sauvages et fermières dans ces régions. L'histoire de la domestication de chacune de ces espèces n'est pas complètement établie, et leur très grande diversité morphologique entraîne de très nombreux débats sur la nomenclature botanique à adopter. Le chou cultivé présente une diversité au niveau soit du bouton floral (choux-fleurs, broccolis), soit des feuilles (choux pommés, chou de Bruxelles, chou fourragers) soit du collet (choux raves). Plusieurs espèces apparentées ont été décrites (Figure 1 ; Snogerup, 1980). Il aurait pu être domestiqué il y a ~2500 av. J.-C., à partir d'une origine unique : *B. cretica* (Mabry *et al.*, 2021), ou d'une espèce apparentée

différente par type morphologique : une pour les choux pommés, une autre pour les choux raves, encore une autre pour les choux-fleurs et les broccolis (Snogerup, 1980). La diversification plus récente (~400 av. J.-C.) aurait conduit aux deux grands types morphologiques, les types floraux (choux-fleurs, broccolis) et les formes feuillues (choux pommés, de Bruxelles ou fourrager) (Cheng *et al.*, 2016). Les formes sauvages présentes en Europe (Angleterre, France et Espagne) pourraient être des formes cultivées retournées à l'état sauvage ou des populations férales (Mittell *et al.*, 2020). La navette-le navet sont cultivés soit pour leur racine (le navet), soit pour leurs feuilles principalement en Asie, soit pour leurs graines oléagineuses. La domestication du type navet ou oléagineux serait la plus ancienne (~3500 av. J.-C.). *B. rapa* aurait été introduite vers ~2000 av. J.-C. en Asie et sélectionnée pour former un groupe à part entière, composé de certaines formes oléagineuses (yellow sarson), le Pak-Choi et le chou chinois (Qi *et al.*, 2017 ; Cheng *et al.*, 2016). De nombreuses formes sauvages existent du nord de l'Europe au nord de l'Afrique. En revanche, il est difficile de distinguer les formes sauvages des populations férales ou des plantes formées par flux de gènes entre les deux (McAlvay *et al.*, 2021).

La place particulière de la France, où co-existent les formes sauvages et cultivées de *B. oleracea* et de *B. rapa*, rend particulièrement importante la préservation des ressources génétiques de ces deux espèces. Au cours des années 1980, Yves Hervé et ses collaborateurs ont collecté, auprès des agriculteurs, les variétés fermières de ces deux espèces (968 pour le chou et 36 pour le navet) sur l'ensemble du territoire français. Celles-ci sont actuellement conservées, en maintenant leur diversité, au sein du CRB BrACySol (<https://www6.rennes.inrae.fr/igep/L-IGEP/Plateformes/BrACySol>). Pour les formes sauvages, seules

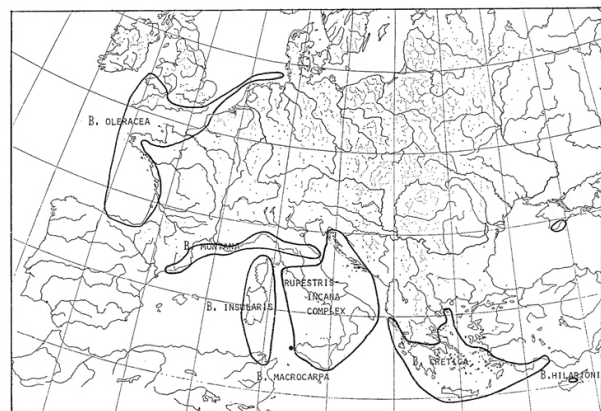


Figure 1. Origine des formes sauvages du chou (*B. oleracea*) et de ses espèces apparentées (*B. montana*, *B. insularis*, *B. macrocarpa*, *B. rupestris*, *B. villosa*, *B. incana*, *B. cretica* et *B. hilarionis*) (d'après Snogerup, 1980)

quelques populations de *B. oleracea* ont été collectées en Normandie par Grégoire Thomas et ses collaborateurs entre 1985-1986. Ce matériel a été testé vis-à-vis de la hernie des Crucifères (*Plasmodiophora brassicae*) et est conservé au CRB (liste BOS). Toutefois, ce matériel est de type bianuel et donc très compliqué à multiplier en accord avec les contraintes culturales du CRB. L'étalement des floraisons sur deux années ne permet pas un croisement entre chaque plant, et la longueur du cycle expose la culture à de fortes contraintes biotiques, en particulier pour la culture

sous serre. Aucune population sauvage ou férale de *B. rapa* n'est actuellement conservée au CRB.

Face aux défis actuels pour élargir la diversité génétique des variétés cultivées et pour faire face aux contraintes biotiques et abiotiques, notamment les changements climatiques, il nous a paru particulièrement important de reprendre les collectes. Ce travail a été initié dans le cadre d'un projet H2020 Prima « BrasExplor » (<https://www6.inrae.fr/brasexplor>), débuté en 2020, et qui réunit 11 partenaires de six pays (France, Espagne, Algérie, Tunisie, Slo-

Tableau 1 : Fiche de description des populations sauvages

Prospecting site sheet	
Date __ / __ / __	N° Site __ __ __
NAME OF THE POPULATION (see nomenclature):	
Collector's name :	
Country :	
Region :	
Province :	
Locality :	
The closest town:	
GPS Latitude : __ __ __	Longitude: __ __ __
Altitude : __ m.	Road map N°
1. Estimated site area:m ²	
2. Plant density of the collected species/m ² :	
3. Organization of the population: patches or continuous population	
4. Number of plants collected for seeds:	
5. Number of pictures localized on the drawing map (enclosed):	
Whole plant: __	
Population: __	
6. Type of land use: __ __	
Not determined 0	Wasteland or fallow 1 Pasture 2
Reaping 3	Pasture / reaping 4 Annual crops 5
Perennial crops 6	Field border 7 Undergrowth 8
Others 9	
7. Land use intensity: __	
Not determined 0	Not cultivated 1 Cultivated 2
8. Animals:	
No 0	Pasture (1 low to 9 high) __
9. Soil work: __	
Not determined 0	No soil work 1
Cultivated field with plowing 2	
10. Irrigation: No 1 Yes 2 __	
If yes, season with irrigation:	
11. Weeding: No 1 Chemical 2 Mechanical 3 __	
12. Degree of artificiality of the site: __	
Natural vegetation 1 to Strong artificialisation 7	
Comments:	
13. Station: __	
sheltered 1	Protected 2 Open 3
14. Exposure: __	
No defined exposure 1	N 2 NE 3 E 4
SE 5 S 6 SW 7	W 8 NW 9
15. Macro-topography: __	
Closed depression 1	Open depression 2 Plain 3
Plateau 4	Lower slope 5 Mid slope 6
Top of slope 7	Summit / Escarpment 8 Dunes 9
16. Slope: __	
Zero 1	from 1 to 10% 2 from 11 to 30% 3 >31% 4
17. Microrelief: __	
Difficult to assess 1	Plan 2 Bumpy 3 Logs 4
Channel 5	Ditch 6 Bank 7
18. Drainage: __	
Zero 1	Low 2 Mid 3 Good 4
19. Apparent site humidity: __	
Not determinable 0	Very dry 1 Dry 2 Average 3
Wet 4	Very wet 5 Open water 6
20. Type of source rock:	
21. Soil depth: __	
Skeletal 1	Normal 2 Deep 3
22. State of the soil surface: __	
Not determinable 0	With a smooth crust 1
With lumpy structure 2	With a gravelly structure 3
23. Soil compaction: __	
Loose 1 to very compact 5	
24. Surface covered by the source rock __ %	
25. Surface covered by pierraille __ %	
26. Surface covered by fine earth or sand __ %	
27. Surface covered by vegetation or litter __ %	
28. Color: Black 1 Red/Brown 2	
Brown 3	clear 4 __
29. Sampling of the soil: yes 1 __	
Please find enclosed the sampling method	
30. Remarks:	
31. Type of plant formation Name :	
Remarks:	
32. Recovery rate: __ __ %	
33. Major species assessed with quadra method:	
Botanical name :	Frequency __ __ %
Botanical name :	Frequency __ __ %
Botanical name :	Frequency __ __ %
Botanical name :	Frequency __ __ %
Botanical name :	Frequency __ __ %
Botanical name :	Frequency __ __ %
Botanical name :	Frequency __ __ %
Botanical name :	Frequency __ __ %
Remarks :	
34. General remarks :	
Draw the population on the back of the sheet	

vénie, Italie). L'objectif est de tirer parti du fait que ces deux espèces, le chou et le navette-navet, existent sous formes sauvage ou fermière du nord de la France à la zone subsaharienne d'Afrique du Nord, ce qui permettrait d'identifier les déterminants génétiques de l'adaptation aux contraintes climatiques. Ce projet permettra également de valoriser les populations fermières. Dans cet article, nous décrivons le matériel en cours de récolte en France.

Description du matériel

Afin de pouvoir comparer les données récoltées par population, nous avons établi une fiche de collecte pour chaque type de populations (Tableaux 1 et 2). L'ensemble de ces informations permettra de disposer des données passeport détaillées. Sur chaque site, dans la mesure du possible, les graines de 30 plantes bien réparties dans la population ont été collectées. De façon similaire, nous avons défini la méthode d'échantillonnage des sols afin

d'établir la structure du microbiote (bar-coding) et la nature physico-chimique du sol : 3 points de récolte de sols sur une profondeur d'environ 10 cm, bien répartis sur la surface de la population, sont mélangés pour réaliser l'ensemble des analyses. Par ailleurs, les données climatiques de chaque site sont disponibles à partir de la base de données (<https://www.worldclim.org/>).

Tableau 2 : Fiche de description des populations fermières

Prospecting sheet: cultivated forms
Name of the population (Cf nomenclature).....

Species: *Brassica rapa* *Brassica oleracea* Country Region

Town Place: GPS Coord. Latitude:

Longitude.....Altitude.....

Name of collector:

Vernacular name of the cultivar:

Local synonyms:

Meaning of name:

1. Place of seed collection: 1 Family garden; 2 market; 3 field; 4 private collection; 5 other

2. Presumed origin of the cultivar:

3. Source of seeds: produced on site: 1 Friends; 2 neighbors; 3 parents; 4 exchange; 5 purchase; 6 market; 7 seed merchant; 8 other

4. Are seeds purchased: 1 Never; 2 Regularly; 3 Occasionally; where?

5. Are seeds exchanged: 1 Never; 2 Regularly; 3 Occasionally; with whom?

6. If the seed is produced locally, how are individuals chosen for propagation? Is there a specific way to do this?

7. Are there similar crops nearby? 1 No/ 2 Yes. Are special precautions taken to isolate the crop?.....

8. Seed conservation: duration storage conditions

9. Importance in the locality: 1 rare; 2 infrequent; 3 frequent; 4 abundant

10. Sowing date:

11. Harvest date:

12. Irrigation: 1 No/ 2 Yes If yes, specify frequency

13. Informant: farmer: other (specify):

14. Use: Human food 1 No/ 2 Yes; Forage: 1 No/ 2 Yes

15. Part used: 1 Root; 2 Leaves; 3 Roots + leaves; 4 other

16. Recorded cooking recipe: 1 No/ 2 Yes; Number of the recipe

17. Destination of the harvest product: 1 Consumed in the family; 2 marketed locally; 3 marketed elsewhere; If 3 where? How?

18. Taste qualities: (flavor, texture or any other particularity)

19. Why is this cultivar kept in cultivation?

20. If it has disappeared, when was its culture abandonedand why

21. How long has it been grown in this place?

22. Is it very cultivated in the region? (delimit the area)

Additional comments:.....

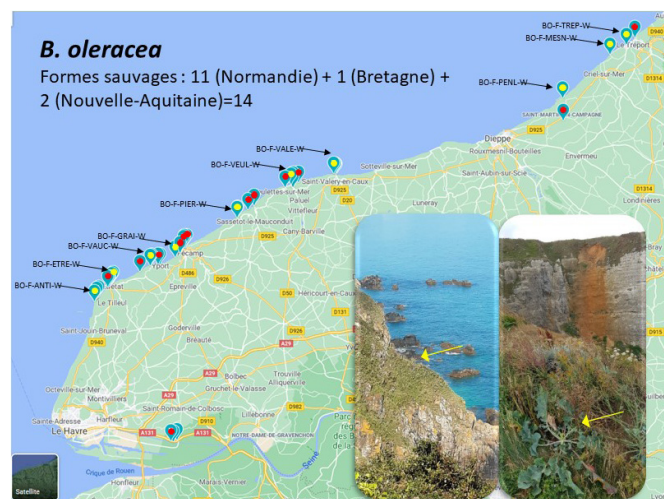


Figure 2. Sites des collectes des populations sauvages de choux situées en région Normandie

Collectes de *B. oleracea*

Sur la base des références anciennes et de la publication récente de Mittell et al. (2020), nous avons collecté 11 populations de choux sauvages bien réparties le long de la côte normande (Figure 2). Ces collectes ont été complétées par une population près de St Brieuc, signalée par le conservatoire botanique de Brest (<http://www.cbnbrest.fr/>), et par deux populations décrites dans la littérature à Mortagne sur Gironde (33). La principale difficulté a été de localiser des plantes qui se développent à mi-falaise ainsi que de réaliser les prélèvements de sol sur les sites. Autant que possible, les graines ont été récoltées sur 30 plantes par population. Par ailleurs, Laurène Gay a pris en charge la collecte de 4 populations de *B. montana* dans le sud-est de la France, avec le soutien du conservatoire de Porquerolles (<http://www.cbnmed.fr/>). Cette espèce très apparentée au chou (Figure 1) est la seule présente sur la côte méditerranéenne française. L'ensemble de ces populations ont été introduites dans le CRB BrACysol, dans lequel elles seront conservées et maintenues.

Pour les populations fermières françaises de choux, nous avons choisi 28 populations conservées au CRB BrACySol. Elles appartiennent aux différents culti-groupes et ont été sélectionnées dans différentes régions du territoire français, afin de disposer d'environnements climatiques très contrastés lors de leur sélection par les agriculteurs (Figure 3).

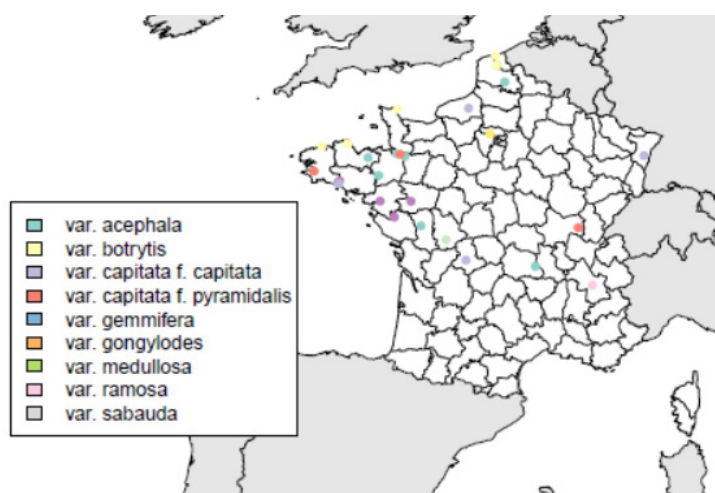


Figure 3. Sites des collectes des populations fermières de choux bien réparties sur le territoire français et appartenant à différents culti-groupes.

Collectes de *B. rapa*

Comme mentionné en introduction, il est particulièrement difficile chez cette espèce de distinguer les formes réellement sauvages des populations férales dans lesquelles le flux de gènes entre formes cultivées et sauvages a pu jouer un rôle. Elle se développe, notamment, en bordure de champ, dans les fossés, en bordure de route ou dans les vignobles du sud-ouest. Cependant, ces populations se maintiennent dans des environnements climatiques très contrastés, ce qui devrait nous permettre d'identifier les déterminants génétiques de l'adaptation aux contraintes climatiques dans le cadre du projet BrasExplor. Nous avons prospecté dans la région Bretagne-Normandie et nous avons pu identifier et collecter 7 populations ainsi que le sol associé (Figure 4). Grâce aux informations fournies par le Conservatoire Botanique National Sud-Aquitaine (<http://www.cbnsa.fr>), nous avons pu collecter 9 populations, principalement dans les zones viticoles, et une en moyenne montagne (Figure 4). Ces collectes restent à poursuivre, notamment dans les régions centre et méditerranéenne françaises. L'ensemble de ces populations ont été introduites dans le CRB BrACySol dans lequel elles seront conservées et maintenues.

Comme pour les choux, 29 populations fermières de navets maintenues au CRB BrACySol ont été choisies, car elles ont été sélectionnées par les agriculteurs dans des environnements climatiques très contrastés (Figure 4).

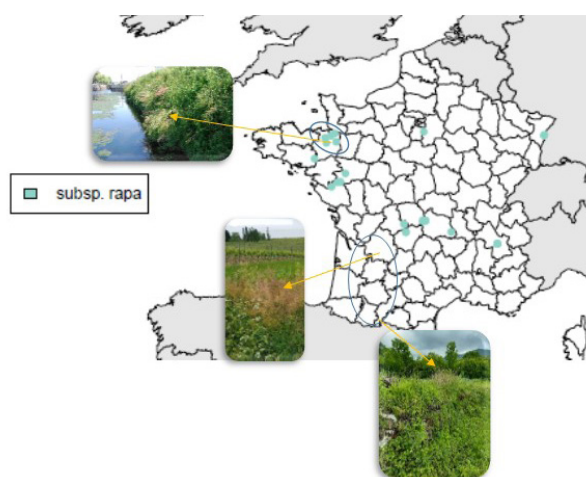


Figure 4. Sites des collectes des populations sauvages de *B. rapa* dans les régions entourées d'un cercle bleu et choix des populations fermières de navets (point bleu clair).

Déroulement prévu du projet BrasExplor

Pour éviter un effet lié à la qualité de la graine, la multiplication de l'ensemble des populations de choux et de navette-navet est réalisée par l'UMR IGEPP sur le domaine de la Motte au Vicomte (Le Rheu). Il est prévu d'étudier environ 100 populations, dont celles précédemment décrites et celles fournies par les différents partenaires (Algérie, Tunisie, Slovénie, Italie, Espagne) pour chacune des deux espèces. Trente plantes par population, issues des différentes plantes mères, sont obtenues en serre. Elles sont contrôlées par cytométrie en flux, pour s'assurer du nombre de chromosomes, et à l'aide du séquençage d'une région du génome chloroplastique afin de s'assurer de l'identité de l'espèce. La même quantité de feuilles par plante est prélevée pour extraction d'ADN, et le séquençage Illumina (profondeur 50x) est réalisé en collaboration avec le Génoscope. Dix plantes retenues par population subissent des conditions de vernalisation adaptées à chaque espèce (un mois à 4 °C sans eau et sans lumière pour les choux, et 1 mois à 6 °C, 8 h jour/16 h nuit avec arrosage pour les navets-navettes), puis repiquées sous mini-cages pour la production de graines. Il a été prévu de prélever et de multiplier cent populations par espèce de 2020 à 2022 (2020-2021 : 62 populations de choux et 28 de navets-navettes / 2021-2022 : 18 populations de choux et 89 de navets-navettes).

Les lectures Illumina obtenues pour chaque population seront mappées sur les génomes de référence de chaque espèce (Belser et al., 2018) afin d'identifier l'ensemble des SNPs (UMR IGEPP). Sur cette base, la structure des populations sera précisée et une core collection par espèce

sera identifiée (UMR AGAP). Les données climatiques et celles physico-chimiques du sol seront utilisées, au regard des données de séquençage par des approches de Genomic-Environmental-Association (GEA), pour identifier les gènes ou régions génomiques candidates associées à l'adaptation des plantes à chaque environnement, ce type d'étude ayant été réalisé sur *Medicago* (Burgarella et al., 2016) (UMR AGAP, UMR IGEPP). Une attention particulière sera portée aux données de microbiote pour tenter d'élucider comment la diversité des plantes est corrélée à l'environnement, comme cela a été réalisé sur *Arabidopsis* (Frachon et al., 2018 ; 2019).

Sur l'ensemble des populations (~100 de choux et ~100 de navets-navettes), des analyses de vigueur germinative en conditions de stress (GEVES), de réponses au froid au cours du développement (CREA-GB, Italie) et de comportement au champ seront réalisées. Ces dernières seront effectuées sur les domaines de l'UE la Motte pour les navets-navettes et de l'UE RGCO à Ploudaniel pour les choux, avec un suivi du microbiote (UMR IGEPP). Les core collections serviront de support pour explorer les réponses aux

températures chaudes, en lien avec l'architecture racinaire et la précocité de floraison (INIA, Espagne) et avec l'auto-incompatibilité pollinique (USTHB, Algérie). Les core collections de chaque espèce seront implantées chez l'ensemble des partenaires (ITCMI, INRAA Algérie, INRAT Tunisie, KIS Slovénie, UNIPA, Italie) pour appréhender, sur la base de descripteurs morphologiques communs, l'adaptation aux contraintes climatiques.

Sur la base de ces données, il est prévu de concevoir des populations de pre-breeding adaptées à chaque pays ainsi que la promotion des populations fermières dans chaque pays.

Ce matériel végétal, caractérisé de façon précise dans le cadre du projet BrasExplor, permettra d'enrichir les ressources génétiques disponibles au sein du CRB pour le chou et les navettes-navets. Ce matériel sera une nouvelle source de diversité génétique pertinente pour les programmes d'amélioration de ces deux espèces, mais pourra également être exploité pour l'amélioration du colza face aux changements climatiques et aux divers stress biotiques. ■

Références

- Belser C., Istace B., Denis E., Dubarry M., Baurens F.C., Falentin C., Genete M., Berrabah W., Chèvre A.-M., Delourme R. et al., 2018. Chromosome-scale assemblies of plant genomes using nanopore long reads and optical maps. *Nature Plants* **4** (11): 879-887.
- Burgarella C., Chantret N., Gay L., Prosperi J.M., Bonhomme M., Tiffin P., Young N. D. and Ronfort J., 2016. Adaptation to climate through flowering phenology: a case study in *Medicago truncatula*. *Molecular Ecology* **25**: 3397-3415.
- Cheng F., Sun R., Hou X., Zheng H., Zhang F., Zhang Y., Liu B., Liang J., Zhuang M., Yunxia Liu Y. et al., 2016. Subgenome parallel selection is associated with morphotype diversification and convergent crop domestication in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. *Nature Genetics* **48**: 1218-1224.
- Frachon L., Bartoli C., Carrere S., Bouchez O., Chaubet A., Gautier M., Roby D. and Roux F., 2018. A Genomic Map of Climate Adaptation in *Arabidopsis thaliana* at a Micro-Geographic Scale. *Frontiers in Plant Sciences*. **9**: 967.
- Frachon L., Mayjonade B., Bartoli C., Hautkèete N.C. and Roux F., 2019. Adaptation to plant communities across the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution* **7**: 1442-1456.
- Mabry M.E., Turner-Hissong S.D., Gallagher E.Y., McAlvay A.C., Hong An H., Edger P.P., Moore J.D., Pink D.A.C., Teakle G.R., Stevens C.J. et al., 2021. The Evolutionary History of Wild, Domesticated, and Feral *Brassica oleracea* (*Brassicaceae*). *Molecular Biology and Evolution*. **38**(10): 4419-4434.
- McAlvay A.C., Ragsdale A.P., Mabry M.E., Qi X., Bird K.A., Velasco P., An H., Pires J.C. and Emshwiller E., 2021. *Brassica rapa* Domestication: Untangling Wild and Feral Forms and Convergence of Crop Morphotypes. *Molecular Biology and Evolution* **38**(8): 3358-3372.
- Mittell E.A., Cobbold C., Zeeshan Ijaz U., Kilbride A., Moore K.A. and Mable B.K., 2020. Feral populations of *Brassica oleracea* along Atlantic coasts in western Europe. *Ecology and Evolution* **10**: 11810-11825.
- Murat F., Louis A., Maumus F., Armero A., Cooke R., Quesneville H., Roest Crollius H. and Salse J., 2015. Understanding *Brassicaceae* evolution through ancestral genome reconstruction. *Genome Biology* **16**: 262.
- Qi X., An H., Ragsdale A.P., Hall T.E., Gutenkunst R.N., Pires J.C. and Barker M.S., 2017. Genomic inferences of domestication events are corroborated by written records in *Brassica rapa*. *Molecular Ecology* **100**: 1-16.
- Snogerup S., 1980. The wild forms of *Brassica oleracea* Group (2n=18) and their possible relations to the cultivated ones. Dans *Brassica crops and wild allies*. Edition Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Nagaharu U., 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*. **7**: 389-452.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

FOCUS

Enrichir les catalogues des CRB : l'exemple des collections microbiennes des Centres de ressources biologiques du CIRM

Anne FAVEL¹
Emmanuelle HELLOIN²
Jean-Luc LEGRAS³
Perrine PORTIER⁴
Florence VALENCE⁵
Michel-Yves MISTOU⁶

CORRESPONDANCE

michel-yves.mistou@inrae.fr

Les missions des Centres de ressources biologiques (CRB), quels que soient leurs objets d'intérêt, sont de collecter, authentifier, conserver et distribuer des ressources biologiques. Ici nous nous intéressons à la mission de collecte, à travers l'exemple du CIRM (Centre international de ressources microbiennes), dont les catalogues de micro-organismes rassemblent des collections spécialisées, si précieuses pour la recherche.

Mais pourquoi et comment enrichir les collections ? Nous apportons quelques réponses à cette question, à l'appui d'exemples tirés de récentes expériences des CRB du CIRM.

1 Unité Biologie et biodiversité fongique, CIRM Champignons filamenteux, Marseille.

2 Infectiologie et santé publique, CIRM-BP, Nouzilly.

3 Sciences pour l'œnologie, CIRM-levures, Montpellier.

4 Institut de recherche en horticulture et semences, CIRM-CFBP, Angers.

5 Sciences des technologies du lait et de l'œuf, CIRM-BIA, Rennes.

6 Mathématiques et Informatiques appliquées du génome à l'environnement, Coordination du CIRM, Jouy-en-Josas.

Intégrer de nouvelles espèces et augmenter la diversité interspécifique

L'activité des CRB s'insère dans le tissu de la recherche et doit servir et accompagner cette dernière ; or, la science évolue, et la diversité des objets biologiques, notamment dans le domaine de la microbiologie, ne se découvre que peu à peu. Les équipes de chercheurs travaillant sur différents environnements, matrices et tissus isolent régulièrement de nouveaux microorganismes ; les CRB doivent donc maintenir une veille pour identifier les échantillons qui enrichiront leurs collections. Par ailleurs, les développements dans les sciences de l'évolution conduisent à de fréquentes révisions de la classification taxonomique, susceptibles de révéler des lacunes dans les collections ; lacunes qui doivent alors être comblées pour assurer la représentativité de la diversité de ces collections. Les CRB spécialisés, comme ceux du CIRM, vont également souhaiter améliorer l'offre de diversité génétique au sein d'espèces connues, quelques variations géniques pouvant conduire à des différences importantes dans leurs propriétés biologiques ou technologiques.

Accroître la diversité pour des espèces à fort potentiel pour supporter l'innovation

Une part importante de l'accroissement des collections vise donc à accroître l'offre de diversité des espèces qui ont un

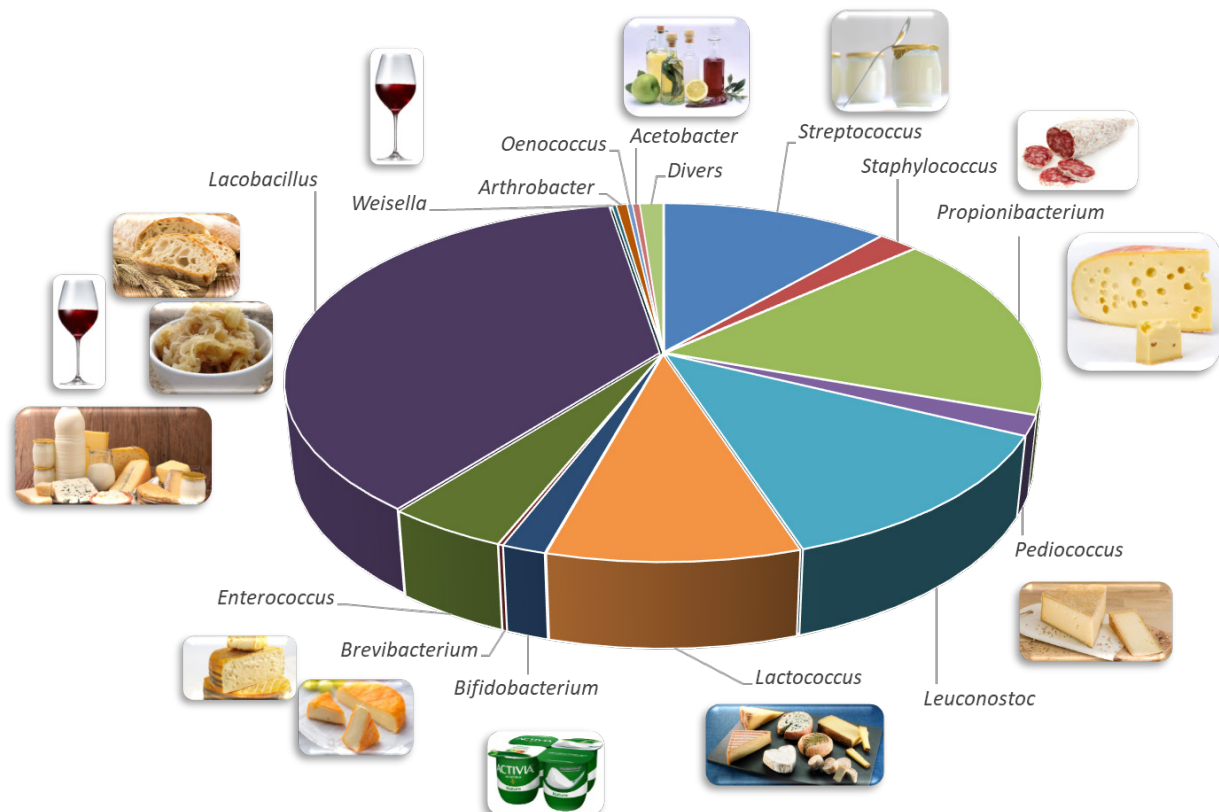
fort potentiel dans des applications traditionnelles ou innovantes. Citons deux exemples issus du catalogue du CIRM-BIA (Figure 1).

D'abord, le cas de l'espèce bactérienne *Streptococcus thermophilus* d'intérêt pour la fabrication de laits fermentés, dont les yaourts. *S. thermophilus* a la capacité de produire des exopolysaccharides qui peuvent modifier la texture des laits fermentés. Il s'avère que cette propriété technologique importante est extrêmement souche dépendante. Dès lors, le fait de disposer d'un panel de souches varié pour cette espèce permet aux industriels de sélectionner celle qui leur permettra d'obtenir un lait fermenté avec la texture désirée.

Sur le même principe, l'espèce bactérienne emblématique de l'Emmental (*Propionibacterium freudenreichii*) a la capacité de produire des composés d'arômes variés, cette capacité étant, là encore, assujettie à la souche. Le fait de pouvoir disposer d'un grand choix de souches pour cette espèce permettrait de moduler l'arôme final des productions d'Emmental.

C'est pour répondre à ce type de besoins que le CIRM-BIA propose, aujourd'hui, à son catalogue, pour ces deux espèces, respectivement 223 et 236 souches les plus variées possibles en termes de biotope et d'origine géographique.

Figure 1. Exemple de la diversité intraspécifique au sein d'un catalogue du CIRM. Le catalogue du CIRM-BIA (bactéries d'intérêt agro-alimentaire) propose quelques 4 000 souches au sein de 160 espèces, mais une douzaine d'espèces clés rassemblent la quasi-totalité du catalogue.



Aller au-delà des souches types pour alimenter la recherche sur les espèces pathogènes

L'étude de la diversité intraspécifique est également importante dans le cas de pathologies émergentes. Il est alors nécessaire d'acquérir des connaissances sur la diversité génétique des souches, d'établir la variabilité des caractéristiques phénotypiques, afin de mieux comprendre les risques associés.

Le projet CekoType, piloté par Pascal Serror (UMR Micalis) a constitué une première étape vers l'élucidation de la pathogenèse d'*Enterococcus Cecorum*, un pathogène aviaire émergent et à fort impact économique, responsable de troubles squelettiques chez les poulets de chair à croissance rapide. Pour cela, une collection de 118 isolats d'*E. Cecorum* a été rassemblée, en collaboration avec le CIRM-BP et des partenaires privés ou académiques français et étrangers. Cette collection comporte principalement des isolats cliniques collectés au cours des dix dernières années dans une quinzaine d'élevages de poulets de chair français ainsi que des isolats commensaux aviaires et des isolats d'origine humaine. L'ensemble des isolats a été ré-identifié, validé au niveau de la pureté et caractérisé en termes de morphotype, puis conservé au CIRM-BP, associé à une collection d'ADN génomiques. Le tout a été mis à disposition de l'ensemble des partenaires du projet. Le séquençage des génomes entiers de l'ensemble des isolats et la génomique comparative ont été utilisés pour rechercher les gènes spécifiques de métabolisme et de virulence. Les capacités de formation de biofilm et d'adhésion au collagène ont été quantifiées afin d'investiguer les caractéristiques d'aptitude et de virulence. Un modèle d'œuf embryonné a également été utilisé pour caractériser la virulence d'une sélection d'isolats. Le projet CekoType fournira le premier ensemble de données sur la diversité génétique des souches d'*E. Cecorum* circulant entre et au sein des élevages.

Positionner les CRB en amont dans les projets de recherche d'exploration de la diversité microbienne pour enrichir leurs catalogues

L'association d'un CRB à des projets de recherche comportant un volet d'exploration de la diversité microbienne présente dans un environnement donné permet la prise en charge de la caractérisation taxonomique des isolats et leur conservation.

Nous décrivons ci-après deux exemples récents de projets de recherche achevés ou en cours ayant conduit à l'isolement de souches qui ont rejoint les collections du CIRM.

Projet ANR PeakYeast (Unité SPO, coord. J.-L. Legras)

Exploration du potentiel adaptatif de population de levures *S. cerevisiae* dans le moût de raisin en prenant compte son microbiote.

Ce projet comprenait un volet d'exploration de la diversité microbienne fongique et bactérienne de moûts de raisins. Les deux CRB impliqués dans le projet, le CIRM-Levures et le CIRM-BIA, ont pris en charge l'isolement et l'identification taxonomique des espèces présentes dans ces moûts avec le souci de maximiser la diversité collectée. Après avoir caractérisé la cohorte de souches de bactéries et levures isolées à l'aide de méthodes moléculaires, un sous ensemble des souches représentant les espèces collectées a été retenu, en limitant les risques de doublons issus d'un même échantillon. Ainsi, 52 souches de bactéries et 180 de levures ont été introduites en collection ; cela a permis d'enrichir les catalogues en souches caractéristiques du moût de raisin et, ainsi, de mieux répondre aux besoins des œnologues et de la communauté scientifique.

Projet de recherche participative Flegme (Unité STLO, coord. Florence Valence)

Analyser la composition des consortia microbiens associés à la lactofermentation des légumes, afin de favoriser la maîtrise des processus fermentaires et encourager ainsi la production d'aliments aux qualités organoleptiques nouvelles.

Dans ce contexte il s'agissait de constituer une collection de référence représentative de la diversité bactérienne associée aux légumes lactofermentés. Pour ce faire, le CIRM-BIA a isolé et identifié 310 isolats, à partir d'échantillons fournis par des citoyens, en optimisant leur diversité, et mené en parallèle la caractérisation de l'écosystème microbien dans son intégralité par des méthodes de metabarcoding (métagénomique ciblée). Les souches isolées dans le cadre de ce projet et les métadonnées associées, dans un contexte d'open science, ont intégré la collection « ouverte » du CIRM-BIA pour être mises à disposition de l'ensemble de la communauté scientifique qui s'intéresse aux fermentations végétales.

Découvrir de nouvelles espèces en menant des campagnes de collecte

Les CRB peuvent également être à l'origine de campagnes de collectes dans des environnements encore peu étudiés ou dans des zones géographiques où une forte biodiversité

té est anticipée. Dans le cadre de l'ANR BioEnergie PNRB E-TriCel (Exploration de la biodiversité enzymatique pour la complémentation du sécrétome de *Trichoderma reesei* afin d'améliorer l'hydrolyse des lignocelluloses), le CIRM-CF a organisé trois campagnes de collectes (2008-2010). Ces campagnes, destinées à explorer la biodiversité fongique naturelle de Guyane, ont été initiées avec les scientifiques de l'UMR Écologie des Forêts de Guyane (EcoFoG) partenaires du projet et, pour certains lieux de collecte, elles ont fait l'objet d'autorisation de la part des autorités locales (Photo 1). Il faut noter que la mise en œuvre, aujourd'hui, du Protocole de Nagoya à travers le dispositif APA (2016) nécessite une déclaration préalable auprès du Ministère de la transition écologique et solidaire. Ces missions ont été effectuées en collaboration avec des mycologues de terrain, spécialistes de la zone Antilles-Guyane, appartenant à la Société Mycologique de France. Au final, elles ont permis une diversification de la collection du CIRM-CF, qui s'est enrichie de 146 souches authentifiées appartenant à des taxons jusque-là non représentés dans la collection, et qui ont été mises à disposition du projet. Les données associées aux souches, en particulier tout ce qui concerne leur origine géographique, sont bien sûr répertoriées dans la base de données du CIRM-CF, et accessibles via le catalogue de la collection. Le CIRM-Levures (Montpellier) a été associé à ces missions et a participé à l'isolement de souches de levures qui ont également rejoint ces collections. Sur 276 souches de levure isolées, 210 correspondaient à 82 espèces connues, tandis que 54 autres étaient réparties dans 51 nouvelles espèces potentielles, dont 8 ont été nouvellement décrites (Amoikon et al., 2018 ; Jacques et al., 2016 ; Jacques et al., 2019). Cet exemple illustre le potentiel que



Photo 1. Mission de terrain en Guyane (de gauche à droite: Pr. R. Courtecuisse, Faculté de Pharmacie de Lille ; Ch. Lechat, SMF ; S. Grisel, INRA, UMR 1163, Marseille ; N. Jacques, INRA/Agroparis Tech ; A. Favel, INRA, UMR 1163, Marseille, Responsable du CIRM-CF.)

recèlent les environnements naturels pour isoler de nouvelles espèces.

Ce type de missions, à caractère naturaliste, qui visent à caractériser la biodiversité microbienne dans les environnements naturels restent rares ; en effet, le financement des expéditions doit se concevoir dans le cadre de projets ayant des objectifs scientifiques précis, et nécessitent de co-construire des questions de recherche avec les équipes. Le CIRM avec son expérience et son expertise permet de construire ces volets biodiversité des projets dans leurs dimensions techniques, mais également réglementaires, devenues essentielles dans le contexte du protocole de Nagoya¹.

Sauvegarder les collections d'intérêt agronomique menacées pour préserver l'avenir

Les priorités des équipes de recherche évoluent dans le temps, et certaines collections ne peuvent plus être conservées dans de bonnes conditions lors du départ de chercheurs ou de changements dans les priorités thématiques des unités. Certaines de ces collections, qui ont parfois été constituées sur plusieurs décennies et qui sont associées à des données de collecte de qualité et caractérisées dans des publications, constituent un patrimoine scientifique de grande valeur. Leur disparition peut donc s'avérer très dommageable pour la communauté scientifique ; le rôle des CRB est alors d'évaluer, sur des critères de complétude des collections et des intérêts de la communauté dans son ensemble, si leur sauvegarde présente un intérêt et de proposer, en accord avec les départements concernés, des rapatriements pour assurer leur sauvegarde.

D'autres situations peuvent également conduire au transfert de collections dans les CRB, alors même que la thématique reste pleinement active au sein d'un collectif de recherche. Ainsi, il arrive que la maintenance de la collection excède les ressources humaines disponibles de sorte que son transfert apparaît comme la meilleure solution pour préserver et distribuer les souches. De telles opérations sont menées régulièrement au sein des CRB du CIRM, en voici, ci-après, quelques exemples récents.

Rapatriement de la collection de souches de *Fusarium* de l'UR MycSA

En 2013, le CIRM-CF a été sollicité par les chercheurs de l'UR MycSA (Villenave d'Ornon) pour rapatrier une collection de plus de 400 souches de *Fusarium sp.*, réparties sur plus

1 Le protocole de Nagoya sur l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation (APA) est entré en vigueur le 12 octobre 2014.

de 25 espèces représentatives des populations françaises inféodées au blé et au maïs. La pérennisation de cette collection de souches bien identifiées et caractérisées, notamment pour leur capacité de production de mycotoxines, était vitale pour la thématique de recherche de l'unité, mais son transfert inévitable en raison des ressources humaines insuffisantes. Après accord du département MICA, à la fois concerné par la collection et par le CIRM-CF, le rapatriement a fait l'objet d'un cahier des charges établi par le CRB en concertation avec l'UR, stipulant entre autres les conditions d'accès aux souches par l'UR MycSA et par un tiers. Au final, cela a donné lieu à la signature d'une Fiche de dépôt entre unités INRAE. Dans le respect du système Qualité du CIRM-CF, certifié ISO 9001, et en accord avec les principes des Centres de Ressources Biologiques, l'intégration des souches à la collection a fait l'objet d'un travail préalable d'authentification des souches par le CRB.

Sauver la collection de souches d'Agaric de l'UR MycSA

Dans un contexte un peu différent, à savoir un départ en retraite associé à une réorientation thématique, le CIRM-CF a procédé, en 2017, au rapatriement d'une collection de près de 800 souches de champignon de Paris (*Agaricus bisporus* en majorité) constituée sur plus de 20 années par l'UR MycSA (Villenave d'Ormon). L'intérêt scientifique de la pérennisation de cette collection du champignon le plus consommé au monde (40 % de la production mondiale) ayant été établi, et après accord des deux départements concernés (SPE pour la collection et MICA pour le CIRM-CF), la procédure de rapatriement s'est déroulée de la même façon que pour la collection de *Fusarium*. L'incontournable étape d'authentification des souches a bénéficié d'un soutien financier des deux départements concernés (CDD, consommables).

La collection de levures de Rhum, UMR QUALITROP Antilles-Guyane

Pour la collection de l'UMR QUALITROP, la restructuration de l'unité et l'arrêt de l'activité de recherche sur les fermentations de produits tropicaux ont posé la question du devenir de cette collection de levures, construite au cours des 40 dernières années. Après prise de contact avec l'ancien responsable de la collection, les souches encore présentes et les informations associées ont été transférées auprès du CIRM-Levures. Du fait des changements importants dans la taxonomie des levures, ces souches ont été systématiquement ré-identifiées avant d'être mises en collection.

Sécuriser la collection de bactéries pathogènes des poissons de la VIM (Jouy-en-Josas) au CIRM-BP

Dans le contexte du proche départ en retraite de Jean-François Bernardet qui avait assemblé, sur plusieurs décennies, une formidable collection de bactéries pathogènes de poissons collectées sur cinq continents, l'équipe Infection et Immunité des Poissons (Éric Ducaud) a sollicité le CIRM-BP. Afin de garantir la conservation d'une sélection représentative de ces souches, des critères de choix ont été établis, comme l'usage fréquent des souches par l'équipe d'origine, la disponibilité de leurs séquences génomiques, l'implication des souches dans des publications et leur caractère unique car non disponibles ailleurs. L'obtention des autorisations de la part des personnes ou instituts ayant initialement transmis les souches à l'équipe de la VIM a également été prise en compte. Après une transmission de savoir-faire de la part du futur retraité, une collection de 295 souches appartenant à 3 espèces du genre *Flavobacterium* et 6 espèces du genre *Tenacibaculum*, isolées entre 1969 et 2016 dans le monde, a ainsi été transférée au CIRM-BP en 2021. Les souches sont actuellement en cours de mise en collection après une procédure d'authentification et de mise en conformité de leur statut vis-à-vis de l'APA/Protocole de Nagoya.

Préserver les intérêts des chercheurs et des unités

Dans de telles situations les CIRM privilégient les contrats de dépôt ouverts qui permettent d'exposer les souches conservées et de les rendre disponibles auprès de la communauté scientifique, tout en maintenant la propriété intellectuelle au déposant original en cas d'exploitation industrielle ou financière de la ressource. Cette solution permet donc, en exposant à travers le catalogue du CIRM les résultats de la recherche, d'optimiser les possibilités de valorisation et les opportunités de collaboration pour les équipes ; ces dernières sont ainsi dispensées des tâches lourdes de conservation et de distribution des ressources, mais gardent le contrôle sur leur utilisation à travers les MTA.

Il est néanmoins possible, aux équipes qui le souhaitent, de déposer, moyennant des frais de garde, leurs collections sous forme de dépôts fermés qui restent confidentiels. Il existe donc de multiples modalités pour faire évoluer les catalogues des CRB microbiens, qui ont toutes leur utilité, selon les circonstances. Un message important à faire passer, auprès des équipes de recherche, est qu'il est généralement judicieux d'associer des CRB lors de la conception de projets de recherche qui comportent un volet d'exploration de la biodiversité ; cela permet que soient pris en compte,

dès la genèse du projet, tous les aspects techniques et réglementaires liés à la construction de collections originales.

Microbiotes, métagénomique et culturomique : de nouveaux défis pour les catalogues des CRB microbiens

Ces dernières années, les apports de la métagénomique ont permis de mesurer l'étendue des espèces microbiennes qui échappent encore à nos techniques de culture. Ainsi, sont apparus des ensembles taxonomiques de microorganismes totalement inconnus des microbiologistes, car trop difficiles à cultiver, trop rares ou présents dans des environnements peu étudiés jusqu'alors (Castelle et Banfield, 2018). À l'heure actuelle, beaucoup des taxons microbiens décrits restent inaccessibles aux approches expérimentales microbiologiques classiques. La recherche doit encore progresser pour manipuler et isoler ces microorganismes, notamment à travers des approches culturomiques.

Les CRB microbiens doivent donc rester à l'affût des développements sur ces fronts de la science, afin de compléter leurs collections et de continuer à offrir à la communauté scientifique des ressources fiables pour les activités de recherche et de développement.

Plusieurs CRB du CIRM sont impliqués dans les projets d'analyse des microbiotes : Microstore (conservation des consortia associés aux plantes) pour le CIRM CFBP, Flegme (Microbiotes des légumes fermentés) pour le CIRM-BIA, Egg-to-meat (Flux bactériens chez le poulet) pour le CIRM-BP ; ils commencent donc à s'équiper dans une perspec-

tive d'analyse culturomique des microbiotes associés aux plantes et aux aliments.

Alors que les projets d'analyse des microbiotes et holobiontes se développent, il nous paraît important que le CIRM et, au-delà, le pilier microbien de RARe avec la bio-banque SAMBO, voire l'ensemble de l'infrastructure RARe, se saisissent des questions spécifiques posées par la manipulation et la conservation des échantillons de microbiotes et la constitution de collections issues de leur analyse culturomique. Il faut noter l'initiative du CIRM qui a rassemblé 5 CRB issus de 3 piliers de RARe (Microbien, Environnement, Animal), pour construire le projet HARMONY dédié à l'évaluation de protocoles d'extraction d'ADN issus de diverses matrices (sols, fèces, fientes, aliments) et d'approches de séquençage innovantes (shallow sequencing, SMRT) pour caractériser les microbiotes. Ce projet s'appuie sur des expertises bio-informatiques existantes au sein des CRB et sur la plateforme MetaQuant de MGP. Le projet, hyper-collaboratif, construit sur de nombreux ateliers pour discuter les protocoles envisagés, a deux objectifs principaux : proposer des procédures techniques standardisées pour les analyses microbiotes et faire monter en compétence les CRB moins rompus à ces analyses.

La réflexion sur le rôle et l'organisation des CRB et bio-banques INRAE dans les études de microbiotes doit se poursuivre, car la pierre angulaire d'une science ouverte et reproductible est de permettre l'accès des chercheurs à du matériel intègre d'un point de vue biologique et réglementaire. ■

Références

Amoikon T.L.S., Grondin C., Djéni T.N., Jacques N., Casaregola S., 2018. *Starmerella reginensis* f.a., sp. nov. and *Starmerella kourouensis* f.a., sp. nov., isolated from flowers in French Guiana. *Int J Syst Evol Microbiol.* 68: 2299–2305. DOI: 10.1099/ijsem.0.002829.

Jacques N., Sarilar V., Urien C., Lopes M.R., Morais C.G., Uetanabaro A.P.T., et al. 2016. Three novel ascomycetous yeast species of the *Kazachstania* clade, *Kazachstania saulgeensis* sp. nov., *Kazachstania serrabonitensis* sp. nov. and *Kazachstania australis* sp. nov. Reassignment of *Candida humilis* to *Kazachstania humilis* f.a. comb. nov. and *Candida pseudohumilis* to *Kazachstania pseudohumilis* f.a. comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 66: 5192–5200. DOI: 10.1099/ijsem.0.001495.

Jacques N., Casaregola S., 2019. Large biodiversity of yeasts in French Guiana and the description of *Suhomyces coccinellae* f.a. sp. nov. and *Suhomyces faveliae* f.a. sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 69: 1634–1649. DOI: 10.1099/ijsem.0.003369.

Castelle C.J., Banfield J.F., 2018. Major New Microbial Groups Expand Diversity and Alter our Understanding of the Tree of Life. *Cell.* 172: 1181–1197. DOI: 10.1016/j.cell.2018.02.016.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Cani-DNA, un CRB qui a du chien !

Réseau de collecte de prélèvements de chiens par les vétérinaires pour la recherche biomédicale et la diversité génétique

Catherine ANDRÉ¹
Nadine BOTHEREL¹
Edouard CADIEU¹
Laetitia LAGOUTTE¹
Benoît HEDAN¹
Annabelle GARAND¹

Jérôme ABADIE²
Laurent TIRET³
Marie ABITBOL⁴
Rachel LAVOUÉ⁵
Guillaume QUENEY⁶
Gilles CHAUDIEU⁷
Richard GUYON¹

CORRESPONDANCE

catherine.andre@univ-rennes1.fr

RÉSUMÉ

Le CRB* Cani-DNA collecte des prélèvements de chiens comme modèles spontanés génétiques et précliniques de maladies génétiques humaines rares et/ou complexes. Depuis 2012, un partenariat a été établi entre le CNRS et les quatre Écoles Nationales Vétérinaires (ENV : Alfort, Nantes, Lyon, Toulouse) et la société de génétique animale Antagene (Lyon). La collecte est réalisée par Cani-DNA, ouverte vers la société, avec la participation volontaire de propriétaires, d'éleveurs de chiens ou de clubs de races, et repose sur un réseau vétérinaire national incluant des praticiens, des laboratoires d'analyses histopathologiques, des cliniques et hôpitaux spécialisés, des centres de cancérologie et d'imagerie, les CHUV* des Écoles Nationales Vétérinaires et l'association AFVAC*. Les prélèvements (sang, plasma et tissus) accompagnés de leurs données généalogiques, phénotypiques et cliniques sont réalisés par des vétérinaires diplômés (DVM), réceptionnés par le CRB qui renseigne la base de données centralisée Cani-DNA (LIMS Modul-Bio) et réalise les extractions d'ADN et d'ARN à partir de ces prélèvements ; le CRB réalise les contrôles qualité et assure le stockage des échantillons correspondants, à -20 °C. Ces échantillons d'acides nucléiques sont ensuite distribués à la communauté scientifique, locale, nationale et internationale pour des projets de recherche apportant un bénéfice mutuel en médecine vétérinaire et humaine et pour des programmes sur la diversité génétique. En 2021, Cani-DNA compte 33 000 échantillons d'ADN extraits à partir de sang, plasma et tissus dont 18 500 ADN stockés sur le site rennais, 10 000 dans les quatre ENV et 4 500 à Antagene. De plus, 6 200 échantillons de tissus sont disponibles (pour 2 000 chiens), plus spécifiquement pour des projets de cancérologie comparée. Ces ressources concernent environ 300 races de chiens et plus d'une centaine de maladies génétiques canines, homologues de maladies génétiques humaines.

MOTS-CLÉS

Centre de Ressource biologique, chien, ADN, ARN, maladies génétiques, diversité génétique, modèle.

1 Institut de Génétique et Développement de Rennes, UMR6290 CNRS-Université de Rennes 1 (IGDR).

2 Oniris, Site de la Chantrerie, 44307 Nantes.

3 École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94700 Maisons-Alfort.

4 VetAgro Sup, 69280 Marcy l'Étoile.

5 École Nationale Vétérinaire de Toulouse, 31076, Toulouse.

6 Antagène, 69890 La Tour de Salvagny.

7 Association Française des Vétérinaires des Animaux de Compagnie (AFVAC), 75008, Paris.

* CRB : Centre de Ressource Biologique.

* CHUV : Centre Hospitalier Universitaire.

* AFVAC : Association Française des Vétérinaires des Animaux de Compagnie.

Cani-DNA, the Biological Resource Center at the head of the pack!

Network of dog sample collection by veterinary practitioners for biomedical and genetic diversity research

Catherine ANDRÉ¹
Nadine BOTHEREL¹
Edouard CADIEU¹
Laetitia LAGOUTTE¹
Benoît HEDAN¹
Annabelle GARAND¹

Jérôme ABADIE²
Laurent TIRET³
Marie ABITBOL⁴
Rachel LAVOUÉ⁵
Guillaume QUENEY⁶
Gilles CHAUDIEU⁷
Richard GUYON¹

CORRESPONDENCE

catherine.andre@univ-rennes1.fr

ABSTRACT

The Cani-DNA BRC* collects samples from dogs used as spontaneous genetic and preclinical models of rare and complex human genetic diseases. Since 2012, a partnership has been established between the CNRS and the four National Veterinary Schools (ENV: Alfort, Nantes, Lyon, Toulouse) and the biotech company Antagene (Lyon). Sample collection is open to interested parties, with the voluntary participation of dog owners, breeders and pedigree clubs, and is based on a national veterinary network including practitioners, histopathology laboratories, clinics and specialized hospitals, oncology and imaging centers, the CHUVs* of the National Veterinary Schools and the AFVAC* Association. Samples and associated genealogical, phenotypic and clinical data are collected by qualified veterinarians (DVM) to implement the centralized Cani-DNA database (LIMS Modul-Bio) and perform DNA and RNA extractions from them. The BRC performs quality controls and stores the corresponding samples at -20 °C. These nucleic acid samples are then distributed to the scientific community at local, national and international levels for mutually beneficial research projects in veterinary and human medicine and for programs on genetic diversity. In 2021, Cani-DNA contained 33,000 DNA samples extracted from blood, including 18,500 DNA samples stored at the Rennes site, 10,000 at the four ENVs and 4,500 at Antagene. In addition, 6,200 tissue samples are available (for 2,000 dogs), in particular for comparative oncology projects. These resources concern approximately 300 breeds of dogs and more than 100 canine genetic diseases homologous to human genetic diseases.

KEYWORDS

Biological Resource Centre, dog, DNA, RNA, genetic diseases, genetic diversity, model.

1 Institut de Génétique et Développement de Rennes, UMR6290 CNRS-Université de Rennes 1 (IGDR).

2 Oniris, Site de la Chantrerie, 44307 Nantes.

3 École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94700 Maisons-Alfort.

4 VetAgro Sup, 69280 Marcy l'Étoile.

5 École Nationale Vétérinaire de Toulouse, 31076, Toulouse.

6 Antagène, 69890 La Tour de Salvagny.

7 Association Française des Vétérinaires des Animaux de Compagnie (AFVAC), 75008, Paris.

* BRC: Biological Resource Centre.

* CHUV: Veterinary University Hospital Centre.

* AFVAC: Companion Animal Veterinary French Association.

Introduction

L'espèce canine, issue de la domestication du loup par l'Homme à la période paléolithique, est la toute première espèce à avoir été domestiquée, il y a au moins 15 000 ans avant J.-C (Frantz et al., 2016), voire dès le paléolithique supérieur (-30 000 ans), selon certaines études. À ce jour, plus de 400 races sont identifiées avec des caractéristiques génétiques uniques ; elles sont souvent issues d'un petit nombre d'animaux fondateurs et constituent chacune un isolat génétique. La combinaison de toutes les races représente un large spectre d'allèles liés à des caractères spécifiques et enrichis dans chaque race par sélection artificielle (Galibert et André, 2006 ; Parker et al., 2004). Ainsi, le chien est devenu une formidable « ressource naturelle » pour l'étude des relations phénotype-génotype, qu'il s'agisse de morphologie, de comportement, de longévité ou de maladies génétiques. En effet, presque toutes les races de chiens sont affectées par une ou plusieurs maladies génétiques, représentant ainsi des alternatives uniques à l'étude de la génétique des maladies mendéliennes homologues rares ou complexes chez l'homme (André et al., 2017). Alors qu'en médecine humaine il demeure difficile de recueillir suffisamment de familles ou de cas/témoins informatifs, le modèle canin représente une excellente opportunité pour identifier des allèles rares ayant un impact majeur ou des allèles fréquents ayant un faible impact, simplement co-sélectionnés, ou même fixés dans certaines races de chiens, en réponse à la sélection faite par les éleveurs (Galibert et André, 2008 ; Ostrander et Wayne, 2005). La recherche de locus prédisposant aux maladies génétiques est donc plus facile chez les chiens. Le chien est un bon modèle car : (i) de nombreuses maladies humaines spontanées sont également diagnostiquées chez les chiens et sont homologues sur les aspects cliniques, histologiques et génétiques ; (ii) dans les races prédisposées, les maladies ségrègent avec des fréquences élevées (jusqu'à 20 %) ; (iii) la physiologie des chiens est plus proche de celle de l'homme que de celle des rongeurs ; (iv) les chiens partagent nos vies et donc notre environnement, et ce sur une période moyenne de dix ans, permettant un suivi clinique et thérapeutique ; enfin, (v) l'échantillonnage et les essais cliniques peuvent être effectués sur des chiens plus facilement que chez l'homme, en respect des règles éthiques.

Plusieurs approches génétiques peuvent être utilisées, comme les analyses d'association génétique (GWAS) ou la liaison génétique, soit au sein d'une même race, par comparaison des atteints et des indemnes (Grall et al.,

2012), soit en choisissant plusieurs races présentant une même maladie ou phénotype, par recherche d'allèles communs aux chiens atteints (Cadieu et al., 2009 ; Hédan et al., 2021 ; Karlsson et al., 2007 ; Parker et al., 2007), soit par une approche multi-races pour détecter plusieurs caractères fixés, comme démontré par le projet CanMap (Vonholdt et al., 2010).

Le chien s'avère également un modèle très pertinent pour pointer des mutations somatiques récurrentes et « drivers » en oncologie comparée (Hédan et al., 2020 ; Ulvén et al., 2017) et pour envisager aussi des essais cliniques chez le chien en amont de l'homme (LeBlanc et al., 2016 ; Paoloni et Khanna, 2007).

Le développement exponentiel des méthodologies « omic » a permis la publication de la séquence du génome d'un Boxer Tasha (Lindblad-Toh et al., 2005), puis les annotations successives de ce génome (Derrien et al., 2012 ; Hoepfner et al., 2014 ; Wucher et al., 2017) et, tout récemment, le séquençage complet de quatre chiens d'autres races, pour enrichir la connaissance du génome de l'espèce (Edwards et al., 2021 ; Field et al., 2020 ; Halo et al., 2021 ; Wang et al., 2021) et les projets de séquençage NGS de plusieurs centaines de génomes entiers (Jagannathan et al., 2019 ; Ostrander et al., 2019 ; Plassais et al., 2019). Ces données ouvrent des opportunités pour la compréhension de la dynamique et de la diversité génétique des génomes de chien ainsi que pour l'analyse des relations phénotype /génotype (Parker et al., 2017 ; Vaysse et al., 2011). La question de la conservation de la diversité génétique et du suivi des maladies génétiques, via des « observatoires » ou des « registres », est en effet devenue une préoccupation majeure des professionnels en élevage canin et de la profession vétérinaire, des sociétés savantes et d'expertise, des associations d'éleveurs et des clubs canins nationaux et internationaux. Ces programmes dépendent fortement de l'accès à des échantillons biologiques bien documentés. Ainsi, la collecte, le stockage, la caractérisation et la distribution d'échantillons biologiques de haute qualité, bien annotés, tels que l'ADN et l'ARN génomique et tissulaire, sont nécessaires pour participer à ces programmes scientifiques sur la génétique canine menés dans le monde entier.

Le CRB Cani-DNA a été créé et développé à partir de l'an 2000 au CNRS de Rennes, en collaboration avec un réseau de vétérinaires praticiens français, puis le laboratoire Antagene et les quatre écoles nationales vétérinaires. L'objectif de Cani-DNA est de collecter des prélèvements biologiques, d'en extraire des échantillons d'acides nucléiques ADN et ARN et de les distribuer après un contrôle qualité, pour des projets de recherche biomédicale, ou pour du stockage en

vue de la conservation génétique. Depuis 2012, Cani-DNA participe au Projet d'Infrastructure Nationale en Biologie et Santé (INBS) CRB-Anim, financé par le premier Programme Investissements d'Avenir (PIA1).

La spécificité de Cani-DNA est de collecter des prélèvements via un réseau de vétérinaires et d'éleveurs en lien très fort avec la société. Ce réseau de collecte volontaire fait de Cani-DNA un exemple unique, dans l'infrastructure RARe (Ressources Agronomiques pour la Recherche), de CRB à vocation biomédicale, qui a établi sa propre Charte éthique (<http://igdr.univ-rennes1.fr/>).

L'objectif de cet article est de décrire le chemin d'un échantillon, de sa collecte à son utilisation, en lien et grâce au projet CRB Anim (www.crb-anim.fr) et, dans la continuité, du pilier « Animal » du projet RARe (www.agrobrc-rare.org).

Organisation de la collecte

Réseau de collecte des prélèvements

La constitution des collections du CRB a été rendue possible grâce à un travail de communication mis en œuvre, depuis les débuts de Cani-DNA, par l'équipe de recherche « Génétique du chien », afin de faire connaître l'existence d'une telle structure de collecte de ressources biologiques canines auprès des publics concernés.

Le réseau est constitué de praticiens vétérinaires issus de cliniques privées, de centres hospitaliers, de cliniques spécialisées ou de centres de cancérologie, de laboratoires d'histopathologie vétérinaire, répartis sur l'ensemble du territoire (Figure 1). Le réseau est renforcé par plusieurs groupes vétérinaires, principalement l'Association française des Vétérinaires pour Animaux de Compagnie (AFVAC).

En outre, plusieurs clubs de race, éleveurs et propriétaires participent activement en informant leurs propres vétérinaires et en envoyant directement des échantillons à Cani-DNA. Un dépliant dédié expliquant l'objectif de Cani-DNA (<http://dog-genetics.genouest.org>) est distribué au réseau vétérinaire et aux clubs de race.

Collecte des prélèvements et données associées

Les prélèvements sont réalisés exclusivement par des vétérinaires diplômés DVM (Diplomate in Veterinary Medicine), via le réseau vétérinaire externalisé décrit ci-dessus. Tous les prélèvements entrés dans Cani-DNA sont issus de



Figure 1. Le réseau vétérinaire de Cani-DNA. Partenaires : les 4 ENV, Antagene et l'AFVAC (Association Française des Vétérinaires des Animaux de Compagnie), laboratoires de biologie et d'histopathologie vétérinaires, ainsi que cliniques et hôpitaux vétérinaires spécialisés.

chiens appartenant à des particuliers ou des éleveurs, qui consentent au prélèvement de leurs chiens.

Le protocole de collecte est le suivant :

- Le sang (2 à 5 ml), prélevé sur EDTA K3, peut être stocké quelques jours à 4 °C avant l'expédition, par le vétérinaire préleveur.
- Les tissus (5 mm³) sont recueillis dans la solution RNAlater (Qiagen) pour préserver l'ARN et l'ADN : tissus atteints et tissus sains (le cas échéant) en tubes séparés.

Pour chaque type de tissu (atteint ou sain), les prélèvements en RNAlater sont dupliqués par un prélèvement « miroir » dans du formol afin d'assurer le diagnostic histologique et de préciser la proportion de tissu atteint dans l'échantillon de RNAlater. Dans certains cas, d'autres fluides biologiques peuvent être envoyés par des vétérinaires, des cyto-ponctions, des blocs FFPE*, des lames histologiques ou tout autre matériel biologique à partir duquel l'extraction d'acide nucléique est possible.

Les données associées comprennent :

- Le questionnaire clinique, la fiche d'identification du chien et le consentement du propriétaire signé, le pedigree du chien et toute autre information clinique pertinente, comme les analyses hématologiques et biochimiques, certificats oculaires, comptes-rendus d'histopathologie, les examens et les rapports radiographiques ou les radios numérisés...
- Le pedigree quand le chien est inscrit au LOF (Livre des Origines Françaises) : les données généalogiques servent à la construction des arbres généalogiques et

* FFPE : Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

à la gestion future des données génétiques. Les chiens pour lesquels l'ADN parental est disponible sont testés pour la compatibilité parentale, à l'aide d'un ensemble de marqueurs microsatellites informatifs (panel ISAG) par Antagene.

Pour réaliser cette collecte, le CRB Cani-DNA fournit des kits contenant le matériel nécessaire aux prélèvements et à leur acheminement vers le CRB. Les kits sont constitués des tubes adaptés au type de prélèvement : tubes vacutainer EDTA pour les prélèvements de sang, tubes Eppendorf avec solution de conservation RNAlater ou formol pour les prélèvements de tissus. Ces tubes sont protégés par une boîte rigide avec papier absorbant et sachet étanche, dans le respect de la règle du triple emballage pour le transport de matériel biologique (Figure 2). Une enveloppe conforme à la norme de transport UN3373 est fournie pour l'envoi des prélèvements.

Le kit est accompagné d'un protocole de prélèvement détaillé, à l'attention du vétérinaire, qui décrit les exigences du CRB pour la bonne identification et conservation des échantillons ainsi que les modalités d'envoi.

Les prélèvements (sang et tissus) collectés par le réseau de praticiens vétérinaires sont envoyés à Cani-DNA Rennes et sont traités et stockés à Cani-DNA Rennes. Les prélèvements de sang et les frottis buccaux, prélevés par Antagene et dédiés à la recherche, sont traités et stockés à Antagene, et les prélèvements de sang ou de tissus prélevés dans les écoles nationales vétérinaires (Nantes, Alfort, Toulouse, Lyon) sont traités et stockés dans chaque école vétérinaire.



Figure 2. Kits fournis, sur demande, aux vétérinaires praticiens pour la collecte des prélèvements.

Gestion des échantillons

La base de données Cani-DNA

Le LIMS (Laboratory Information Management System)

développé par MoDul-Bio® est utilisé pour saisir et gérer les échantillons et leurs données associées. Chaque prélèvement de chien a un numéro d'identification Cani-DNA unique défini par la chronologie de l'enregistrement ; ce numéro est associé aux informations que sont : le nom du chien, de la race, le numéro de puce/tatouage, le sexe, la date de naissance, la couleur du pelage, les références du ou des vétérinaires... Une fois l'extraction d'ADN réalisée, chaque prélèvement « transformé » en ADN/ARN est alors lié à la quantité et à la concentration de l'acide nucléique, avec la date d'extraction. La présence/absence du pedigree, le consentement écrit du propriétaire et les documents cliniques qui l'accompagnent sont également renseignés. Les mesures des caractères phénotypiques (p. ex., poids corporel, taille, etc.) et toute autre information liée au chien ou à la maladie sont consignées dans la mesure du possible. La page Cani-DNA est accessible via le site Web (<http://dog-genetics.genouest.org>) ou via le site Web de Biosit (<https://biosit.univ-rennes1.fr/centre-de-ressources-biologiques-crb-cani-dna>). Les collections de Cani-DNA sont exportées, au moins une fois par an, sur la base de données de CRB-Anim, afin d'être accessibles également via le portail commun au pilier animal (<https://crb-anim.fr/access-to-collection/#>).

Le traitement des échantillons

À réception, les échantillons de sang sont entreposés à 4 °C. Les tissus fixés dans le formol ou les blocs FFPE (fixés en paraffine) sont stockés à température ambiante avant d'être transmis au laboratoire d'anatomopathologie pour le diagnostic des prélèvements miroirs. Les tissus en RNAlater sont congelés à -20 °C, avant l'extraction des ADN ou ARN. Les non-conformités (p. ex., tubes brisés, manque de documents, données incomplètes) sont indiquées dans la base de données Modul-Bio pour implémenter l'analyse des risques.

L'ADN génomique est extrait à partir de 2 à 5 ml de sang collecté sur EDTA avec le kit Nucleospin Blood L (Macherey Nagel) ; deux éluions (dans 200 µl d'ADN) sont effectuées. La concentration d'ADN et la pureté de l'échantillon sont mesurées (A260/A280, A260/A230) avec le spectrophotomètre Nanodrop™ 1000 (Thermo Scientific). Le cas échéant, l'amplification par PCR d'un fragment d'ADN de 300-400 pb est effectuée sur chaque échantillon d'ADN et vérifiée sur gel d'agarose BET à 2 %. Les extraits d'ADN sont étiquetés avec des codes barres et stockés à -20 °C.

L'ADN ou l'ARN des tissus sont extraits avec le Kit Nucleospin Tissue, (Macherey Nagel) et le Kit Nucleospin RNA II, (Macherey Nagel) respectivement. Une étape de lyse à

chaud s'est avérée nécessaire pour optimiser l'extraction. La concentration d'ADN et la pureté de l'échantillon sont mesurées (A260/A280, A260/A230) avec le spectrophotomètre Nanodrop™ 1000 (Thermo Scientific). Les concentrations obtenues varient de 50 à 300 ng/μl dans la première élution de 200 μl, ce qui garantit une quantité minimale de 10 μg d'ADN génomique par échantillon. La qualité et l'intégrité de l'ARN (RIN) sont évaluées à l'aide du bioanalyseur Agilent 2100 et du nano kit RNA 6000 (Agilent), et les extraits sont stockés à -80 °C.

Les échantillons de sang restants, la deuxième élution d'ADN et le reste des tissus de RNeasy sont conservés et stockés dans un autre congélateur à -20 °C.

Des contrôles qualité comprenant des mesures de Densité Optique (Nanodrop™) et des réactions de PCR classiques sont systématiquement faits pour vérifier la quantité et la qualité des échantillons avant leur distribution. Les envois contiennent les échantillons biologiques emballés de façon sécurisée dans 3 contenus, un document de MAD (Mise À Disposition) des échantillons, et/ou un MTA (Material Transfer Agreement) et les documents associés (pedigree, données cliniques...) ainsi qu'une liste des échantillons avec les informations nécessaires dans un fichier excel.

Gestion de Cani-DNA

Depuis 2012, la gestion de Cani-DNA est effectuée par le responsable scientifique et un comité de pilotage, afin de gérer collectivement les entrées et sorties d'échantillons avec les sites du réseau Cani-DNA. Le comité de pilotage est composé de 9 personnes : le responsable scientifique et le responsable qualité de Cani-DNA Rennes, un représentant d'Antagene et de chacune des quatre Écoles Nationales Vétérinaires, ainsi que de deux vétérinaires praticiens / membres de l'AFVAC. Il vise à établir des procédures qualité, à répondre aux demandes d'échantillons et à accroître les échanges de pratiques et d'échantillons au niveau national et international.

Les collections de Cani-DNA en 2021 : exemple du site de Rennes

Depuis l'année 2000, mais surtout depuis 2005, le site de Rennes a collecté des échantillons de sang de 18 500 chiens et des échantillons de tissus de 6 200 chiens. Tous les prélèvements de sang ont été extraits en ADN génomique et les 6 200 tissus ont été stockés pour des extractions d'ADN et d'ARN selon les besoins. La collecte a progressé régulièrement (Figures 3a et 3b). Parmi ces 18 500 chiens prélevés, 6 000 ont des informations généalogiques. Concernant les tissus collectés, 1 à 6 prélève-

ments de tissus (tissus atteints et sains du même animal, le cas échéant) sont fournis, soit en moyenne 3 prélèvements de tissus par chien. Au total, nous avons collecté plus de 6 000 prélèvements provenant de 2 000 chiens pour différentes maladies, essentiellement des cancers (Figure 3b). Les chiens échantillonnés pour des projets en oncologie ont eu un diagnostic histopathologique. La plupart des chiens ont été collectés en France, mais certains ont été obtenus à partir de pays européens proches.

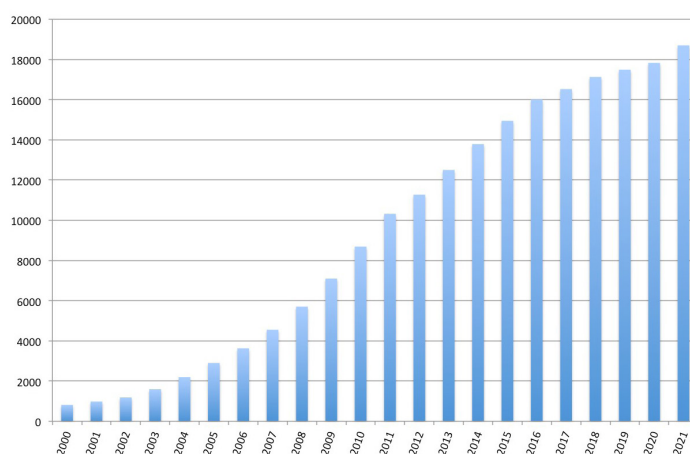


Figure 3a. Nombre de chiens avec un prélèvement sanguin collectés pour le site de Rennes par le réseau vétérinaire de Cani-DNA, entre l'année 2000 et l'année 2021.

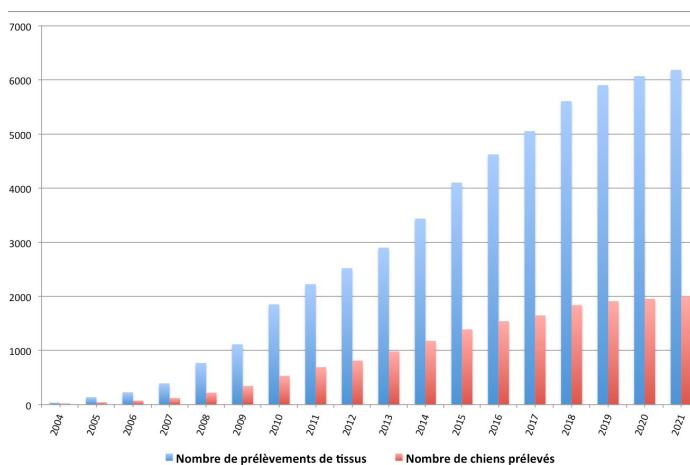


Figure 3b. Nombre de prélèvements de tissus (en bleu), en fonction du nombre de chiens prélevés (en rouge) pour le site de Rennes, par le réseau vétérinaire de Cani-DNA, entre l'année 2000 et l'année 2021.

La collection actuelle représente 300 races (Figure 4a, 4b), avec un effectif par race allant de 2 chiens, pour les nombreuses races régionales françaises à faible effectif, à des centaines de chiens voire quelques milliers, comme par exemple pour le Bouvier bernois (2 538 chiens prélevés). Dans plusieurs races pour lesquelles les clubs de races et/ou les éleveurs sont fortement impliqués, la plupart des

chiens, voire certaines portées entières, sont désormais systématiquement collectés, lors des examens d'enregistrement ou de confirmation. La moitié des échantillons d'ADN canin provient d'animaux malades, et l'autre moitié, issue de chiens indemnes, sert de témoin, en sélectionnant la race, l'âge ou d'autres critères pertinents pour les études génétiques. Ces échantillons d'ADN sont également utilisés pour déterminer la fréquence des altérations génétiques identifiées dans les races d'intérêt ainsi que dans un panel de chiens indemnes de plusieurs races.

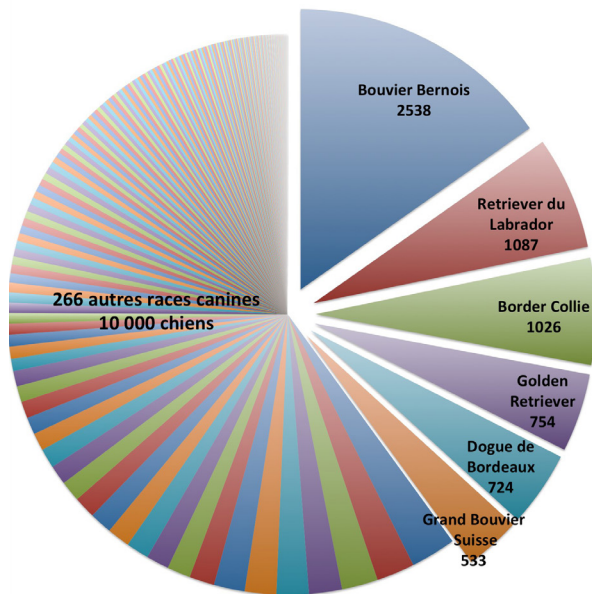


Figure 4a. Proportion de races de chiens représentées au site de Rennes du CRB Cani-DNA en Octobre 2021.

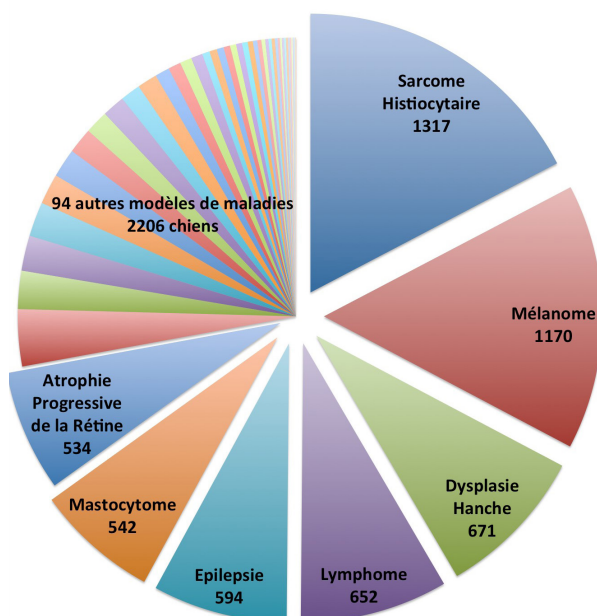


Figure 4b. Proportion des maladies génétiques représentées (nombre de chiens atteints issus de différentes races) dans le site de Rennes du CRB Cani-DNA en Octobre 2021.

Les collections concernent 101 maladies génétiques humaines homologues, principalement des cancers, des affections dermatologiques, neuro-sensorielles ou des anomalies du développement (Tableau 1 et Figures 4a et 4b). Les cancers représentés sont principalement des mélanomes, sarcomes, ostéosarcomes, lymphomes ..., avec leurs différents sous-types. Trois types de maladies neuro-sensorielles sont particulièrement représentés ainsi que certaines affections dermatologiques. Les anomalies du développement concernent le squelette (crâne, queue) et les variations de couleur des robes (différents blancs par exemple, bringés, spots, merle, ...).

Tableau 1 : Nombre de chiens atteints de cancers (en gris), géro-dermatoses (en jaune), maladies neuro-sensorielles (en mauve) (Cani-DNA site de Rennes), en Octobre 2021.

MALADIES	NOMBRE DE CHIENS ATTEINTS
Mélanomes	1200
Sarcome Histiocytaire	1300
Carcinome épidermoïde	50
Mastocytomes	558
Ostéosarcomes	100
Lymphomes	440
Gliomes	22
Ichtyose	33
Hyperkeratose	30
Atrophie Progressive de la rétine	160
Auto-mutilation (neuropathie)	30
Epilepsie	216

En complément du site de Rennes, les partenaires de Cani-DNA présentent des spécificités, associées à des services spécialisés et particulièrement motivés des ENV, ou des collaborations de longue date avec des spécialistes de pathologies humaines et/ou vétérinaires. Ainsi, les anomalies cardiaques (myocardiopathies dilatées, maladies des valves mitrales, ...) ont été principalement collectées par Antagene et l'ENV d'Alfort, l'échantillonnage pour les maladies des organes internes (hépatopathies, néphropathies, ...) a été principalement réalisé par l'ENV de Toulouse, pour les tumeurs mammaires par Oniris (ENV Nantes), et pour les lymphomes et affections neurologiques, par VetAgro Sup (ENV Lyon).

Ces échantillons d'ADN canin ou de tissus sont intéressants pour la communauté médicale, mais aussi pour la communauté de recherche sur le chien pour développer de nouveaux outils génomiques/génétiques propres à cette espèce. Ainsi, Cani-DNA a été sollicité par des sociétés de

biotechnologies pour valider des puces de génotypage, comme Illumina (150 ADN de différentes races de chiens fournis pour valider la puce SNP Illumina HD 170 K ; Illumina, San Diego, US) ou, plus récemment, par Affymetrix (384 ADN de différentes races de chiens fournis pour valider la puce de génotypage SNP Axiom 600K). De nombreux échantillons, ADN et ARN, ont été utilisés pour du séquençage NGS (Next Generation Sequencing) : ainsi 254 échantillons ont été utilisés pour le consortium « 10 000 génomes de chiens » (Ostrander et al., 2019) ou pour le projet DBVDC (Dog Biomedical Variant Database Consortium, Université de Berne) (Jagannathan et al., 2019). Cani-DNA est également sollicité pour développer de nouveaux tests génétiques pour le chien : 170 échantillons d'ADN de races françaises ont été fournis à la Société Mars – Petcare & Petfood, pour compléter le test d'identification génétique des races canines.

Plusieurs collaborations avec Antagene ont conduit au développement de 7 tests génétiques pour le diagnostic et le dépistage de maladies génétiques canines : ichthyose chez le Golden retrievers : Test ICHT-A, avec brevet international (Grall et al., 2012), keratodermie chez les Dogues de Bordeaux : Test HFH-B (Plassais et al., 2015) et chez les Terriers irlandais : Test HFH-A (Drögemüller et al., 2014), neuropathies chez les chiens de chasse : Test AMS (Correard et al., 2019, 2016 ; Plassais et al., 2016), et plusieurs phénotypes comme la « queue courte » (Hytönen et al., 2009) ou des couleurs de robes pour plusieurs races : Test Merle (Hédan et al., 2006) et Test INT (Hédan et al., 2019).

Conclusion

Le CRB Cani-DNA, présenté ici, fournit une ressource unique d'ADN et d'ARN annotés de chiens, dans le respect des règles éthiques et avec une approche unique de travail

avec les chiens, naturellement malades, comme modèles spontanés de pathologie pour la médecine humaine, mais aussi pour la médecine vétérinaire. Nous avons rédigé une Charte d'éthique, afin d'exposer cette démarche unique qui vise à conserver des ressources biologiques/génétiques dans un cadre non expérimental avec et pour le chien.

En Europe, d'autres CRB pour les ressources génétiques canines ont également été développés, comme la biobanque DNA-archives (Université de Liverpool), la biobanque suisse (Université de Berne) ou les biobanques nordiques de l'Université d'Helsinki et d'Uppsala. Des collaborations ont été mises en place avec le projet européen LUPA 2008-2012. Certaines de ces collaborations sont toujours actives avec la communauté de recherche canine européenne pour faciliter les échanges d'échantillons, dans le but de conserver et de proposer des échantillons annotés et de haute qualité.

En plus des projets scientifiques biomédicaux pour la santé humaine et canine, Cani-DNA offre également la possibilité de déposer / stocker les ressources génétiques de certaines races d'intérêt ou de chiens champions d'intérêt : les clubs de races de chiens à petits effectifs et spécifiques de certaines régions de France ou d'autres pays, les sociétés canines nationales et les clubs de races locales s'intéressent de plus en plus à la possibilité de conserver les ADN de leurs races.

Enfin, nous travaillons à combiner les informations du CRB « génétique/génomique » de Cani-DNA avec celles des biobanques canines « reproductives » installées dans les écoles vétérinaires nationales de Maisons-Alfort et de Lyon, afin d'enrichir mutuellement ces deux types de ressources, par des informations croisées (tests génétiques, analyses de la présence de maladies, conservation des gamètes de chiens champions, ...), qui seront utiles pour la recherche biomédicale pour le chien et pour l'homme. ■

Remerciements

Les auteurs remercient tout particulièrement les collègues de l'IGDR : Laetitia Herbin, Amaury Vaysse, Aline Primot, Noémie Foyart, Clotilde de Brito, Anne-Sophie Guillory, Florent Rollin, Stéphanie Robin, Fred Allais et Louis Le Nezet. Les auteurs saluent les contributions des collègues des ENV : Frédérique Sauvaget, Lucie Chevallier, Catia Silva-Dias, Maud Debreuque ; les collègues d'Antagene : Anne Thomas et Caroline Dufaure de Citres ; les vétérinaires praticiens de l'AFVAC : Eric Guaguere, Patrick Devauchelle, ainsi que Romain François, au CHV MicenVet, et la Société Centrale Canine Française SCC. Nous remercions les vétérinaires partout en France et proche Europe pour avoir collecté les prélèvements et fourni des données cliniques et généalogiques, et les nombreux propriétaires de chiens, éleveurs et clubs de race pour leur active participation. Nous remercions également les laboratoires d'histopathologie vétérinaire, notamment le LHA, devenu LabOniris de l'ENV à Nantes, le LAPVSO de Toulouse, le laboratoire Idexx, Alfort et le LAPV d'Amboise. Nous remercions Lionel Martignat et Sonia Becavin, à la Plateforme de Biologie Moléculaire d'ONIRIS, ENV Nantes. Nous remercions Jocelyne Le Seyec, CRITT Santé Bretagne, Univ Rennes 1, ainsi que B. Turlin du CRB Santé du CHU de Rennes et B. Clément de l'INSERM Ugg1, Rennes, France, pour leurs conseils et leur soutien, depuis les débuts de Cani-DNA. Nous exprimons notre reconnaissance à Thierry Guillaudeau et Charles Pineau (Directeurs de l'UMS3480, Biosit) et au service des plateformes de l'UR1, pour avoir accueilli Cani-DNA au sein des locaux de Biosit (depuis 2017) ; à Alice Parnel (SATT, Rennes) pour le travail sur la tarification (2019), à Hugo Cousillas (CREEA - Comité Rennais d'Éthique en Expérimentation Animale, Rennes) et Virginie Vallet (Ministère de la recherche) pour le travail sur notre charte d'éthique. Enfin, nous remercions Michèle Tixier Boichard, en tant que coordinatrice du projet PIA1 CRB-Anim pour son suivi et ses encouragements continus, ainsi que nos tutelles (CNRS, DR17 Bretagne et Pays de Loire et Univ Rennes 1) et Reynald Gillet, notre directeur d'Unité UMR 6290, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes).

Financements

Ce CRB a été créé en 2000 et financé par le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) France, l'Infrastructure Nationale en Biologie Santé IBISA (Co-financement avec le CRB Santé du CHU de Rennes 2012 ; AO CRB 2015 ; AO CRB 2021) et par le projet CRB-Anim, PIA1 (2012-2022), INBS Infrastructure en Biologie Santé ANR-11-INBS-0003.

Références

André, C., Guaguere, E., Chaudieu, G., Genevois, J.-P., Devauchelle, P. (2017). Intérêt du chien dans la pathologie comparée et la génétique : exemples de ressources et de programmes partagés [The importance of dogs for comparative pathology et genetics: Examples of shared resources et programmes]. *Rev. Vét. Clin.* 52, 55-70.

Cadiou, E., Neff, M.W., Quignon, P., Walsh, K., Chase, K., Parker, H.G., VonHoldt, B.M., Rhue, A., Boyko, A., Byers, A. (2009). Coat variation in the domestic dog is governed by variants in three genes. *Science* 326, 150-153.

Correard, S., Plassais, J., Lagoutte, L., Botherel, N., Thibaud, J.-L., Hédan, B., Richard, L., Lia, A.-S., Delague, V., Mège, C., Mathis, S., Guaguère, E., Paradis, M., Vallat, J.-M., Quignon, P., André, C. (2019). Canine neuropathies: powerful spontaneous models for human hereditary sensory neuropathies. *Hum. Genet.* 138, 455-466. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02003-x>.

Correard, S., Plassais, J., Lagoutte, L., Paradis, M., Guaguère, E., Quignon, P., Derrien, T., André, C. (2016). A spontaneous dog model for a human sensory neuropathy: identification of a mutation in the upstream region of a neurotrophic factor. *Bull. Académie Vét. Fr.* 169, 190-194. <https://doi.org/10.4267/2042/61953>.

Derrien, T., Vaysse, A., André, C., Hitte, C. (2012). Annotation of the domestic dog genome sequence: finding the missing genes. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 23, 124-131. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9372-0>.

Drögemüller, M., Jagannathan, V., Becker, D., Drögemüller, C., Schelling, C., Plassais, J., Kaerle, C., Dufaure de Citres, C., Thomas, A., Müller, E.J., Welle, M.M., Roosje, P., Leeb, T. (2014). A mutation in the FAM83G gene in dogs with hereditary footpad hyperkeratosis (HFH). *PLoS Genet.* 10, e1004370. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004370>.

Edwards, R.J., Field, M.A., Ferguson, J.M., Dudchenko, O., Keilwagen, J., Rosen, B.D., Johnson, G.S., Rice, E.S., Hillier, L.D., Hammond, J.M., Towarnicki, S.G., Omer, A., Khan, R., Skvortsova, K., Bogdanovic, O., Zammit, R.A., Aiden, E.L., Warren, W.C., Ballard, J.W.O. (2021). Chromosome-length genome assembly and structural variations of the primal Basenji dog (*Canis lupus familiaris*) genome. *BMC Genomics* 22, 188. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07493-6>.

- Field, M.A., Rosen, B.D., Dudchenko, O., Chan, E.K.F., Minoche, A.E., Edwards, R.J., Barton, K., Lyons, R.J., Tuipulotu, D.E., Hayes, V.M., D Omer, A., Colaric, Z., Keilwagen, J., Skvortsova, K., Bogdanovic, O., Smith, M.A., Aiden, E.L., Smith, T.P.L., Zammit, R.A., Ballard, J.W.O. (2020). Canfam_GSD: De novo chromosome-length genome assembly of the German Shepherd Dog (*Canis lupus familiaris*) using a combination of long reads, optical mapping, and Hi-C. *GigaScience* 9, g1aa027. <https://doi.org/10.1093/gigascience/g1aa027>.
- Frantz, L.A.F., Mullin, V.E., Pionnier-Capitan, M., Lebrasseur, O., Ollivier, M., Perri, A., Linderholm, A., Mattiangeli, V., Teasdale, M.D., Dimopoulos, E.A., Tresset, A., Duffraisse, M., McCormick, F., Bartosiewicz, L., Gál, E., Nyerges, É.A., Sablin, M.V., Bréhard, S., Mashkour, M., Bălăşescu, A., Gillet, B., Hughes, S., Chassaing, O., Hitte, C., Vigne, J.-D., Dobney, K., Hänni, C., Bradley, D.G., Larson, G. (2016). Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. *Science* 352, 1228–1231. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3161>.
- Galibert, F., André, C. (2008). The dog: A powerful model for studying genotype–phenotype relationships. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 3, 67–77.
- Galibert, F., André, C. (2006). The dog and its genome. *Med. Sci.* MS22, 806–808. <https://doi.org/10.1051/medsci/20062210806>
- Grall, A., Guaguère, E., Planchais, S., Grond, S., Bourrat, E., Hausser, I., Hitte, C., Le Gallo, M., Derbois, C., Kim, G.-J. (2012). PNPLA1 mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans. *Nat. Genet.* 44, 140–147.
- Halo, J.V., Pendleton, A.L., Shen, F., Doucet, A.J., Derrien, T., Hitte, C., Kirby, L.E., Myers, B., Sliwerska, E., Emery, S., Moran, J.V., Boyko, A.R., Kidd, J.M. (2021). Long-read assembly of a Great Dane genome highlights the contribution of GC-rich sequence and mobile elements to canine genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, e2016274118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016274118>.
- Hédan, B., Cadieu, E., Botherel, N., Dufaure de Citres, C., Letko, A., Rimbault, M., Drögemüller, C., Jagannathan, V., Derrien, T., Schmutz, S., Leeb, T., André, C. (2019). Identification of a Missense Variant in MFSD12 Involved in Dilution of Phaeomelanin Leading to White or Cream Coat Color in Dogs. *Genes* 10, E386. <https://doi.org/10.3390/genes10050386>.
- Hédan, B., Cadieu, É., Rimbault, M., Vaysse, A., Dufaure de Citres, C., Devauchelle, P., Botherel, N., Abadie, J., Quignon, P., Derrien, T. (2021). Identification of common predisposing loci to hematopoietic cancers in four dog breeds. *PLoS Genet.* 17, e1009395.
- Hédan, B., Corre, S., Hitte, C., Dréano, S., Vilboux, T., Derrien, T., Denis, B., Galibert, F., Galibert, M.-D., André, C. (2006). Coat colour in dogs: identification of the merle locus in the Australian shepherd breed. *BMC Vet. Res.* 2, 9. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-9>.
- Hédan, B., Rault, M., Abadie, J., Ulvé, R., Botherel, N., Devauchelle, P., Copie-Bergman, C., Cadieu, E., Parrons, M., Alten, J., Zalcmán, E.L., Cario, G., Damaj, G., Mokhtari, K., Le Loarer, F., Coulomb-Lhermine, A., Derrien, T., Hitte, C., Bachelot, L., Breen, M., Gilot, D., Blay, J.Y., Donadieu, J., André, C. (2020). PTPN11 mutations in canine and human disseminated histiocytic sarcoma. *Int. J. Cancer* 147, 1657–1665. <https://doi.org/10.1002/ijc.32991>.
- Hoeppner, M.P., Lundquist, A., Pirun, M., Meadows, J.R.S., Zamani, N., Johnson, J., Sundström, G., Cook, A., FitzGerald, M.G., Swofford, R., Mauceli, E., Moghadam, B.T., Greka, A., Alföldi, J., Abouelleil, A., Aftuck, L., Bessette, D., Berlin, A., Brown, A., Gearin, G., Lui, A., Macdonald, J.P., Priest, M., Shea, T., Turner-Maier, J., Zimmer, A., Lander, E.S., di Palma, F., Lindblad-Toh, K., Grabherr, M.G. (2014). An improved canine genome and a comprehensive catalogue of coding genes and non-coding transcripts. *PLoS One* 9, e91172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091172>.
- Hytönen, M.K., Grall, A., Hédan, B., Dréano, S., Seguin, S.J., Delattre, D., Thomas, A., Galibert, F., Paulin, L., Lohi, H., Sainio, K., André, C. (2009). Ancestral T-box mutation is present in many, but not all, short-tailed dog breeds. *J. Hered.* 100, 236–240. <https://doi.org/10.1093/jhered/esn085>.
- Jagannathan, V., Drögemüller, C., Leeb, T., Consortium (DBVDC), D.B.V.D., Aguirre, G., André, C., Bannasch, D., Becker, D., Davis, B., Ekenstedt, K. (2019). A comprehensive biomedical variant catalogue based on whole genome sequences of 582 dogs and eight wolves. *Anim. Genet.* 50, 695–704.
- Jagannathan, V., Hitte, C., Kidd, J.M., Masterson, P., Murphy, T.D., Emery, S., Davis, B., Buckley, R.M., Liu, Y.-H., Zhang, X.-Q. (2021). Dog10K_Boxer_Tasha_1.0: A long-read assembly of the dog reference genome. *Genes* 12, 847.
- Karlsson, E.K., Baranowska, I., Wade, C.M., Hillbertz, N.H.S., Zody, M.C., Eterson, N., Biagi, T.M., Patterson, N., Pielberg, G.R., Kulbokas, E.J. (2007). Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nat. Genet.* 39, 1321–1328.
- LeBlanc, A.K., Breen, M., Choyke, P., Dewhirst, M., Fan, T.M., Gustafson, D.L., Helman, L.J., Kastan, M.B., Knapp, D.W., Levin, W.J., London, C., Mason, N., Mazcko, C., Olson, P.N., Page, R., Teicher, B.A., Thamm, D.H., Trent, J.M., Vail, D.M., Khanna, C. (2016). Perspectives from man's best friend: National Academy of Medicine's Workshop on Comparative Oncology. *Sci. Transl. Med.* 8, 324p5. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf0746>.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J.L., Kulbokas, E.J., Zody, M.C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R.K., Ostrander, E.A., Ponting, C.P., Galibert, F., Smith, D.R., deJong, P.J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C.-W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M.J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K.-P., Parker, H.G., Pollinger, J.P., Searle, S.M.J., Sutter, N.B., Thomas, R., Webber, C., Lander, E.S. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438, 803–819. <https://doi.org/10.1038/nature04338>.

Ostrander, E.A., Wang, G.-D., Larson, G., Vonholdt, B.M., Davis, B.W., Jagannathan, V., Hitte, C., Wayne, R.K., Zhang, Y.-P. (2019). Dog10K: an international sequencing effort to advance studies of canine domestication, phenotypes et health. *Natl. Sci. Rev.* 6, 810–824.

Ostrander, E.A., Wayne, R.K. (2005). The canine genome. *Genome Res.* 15, 1706–1716.

Paoloni, M.C., Khanna, C. (2007). Comparative oncology today. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 37, 1023–1032.

Parker, H.G., Dreger, D.L., Rimbault, M., Davis, B.W., Mullen, A.B., Carpintero-Ramirez, G., Ostrander, E.A. (2017). Genomic Analyses Reveal the Influence of Geographic Origin, Migration, et Hybridization on Modern Dog Breed Development. *Cell Rep.* 19, 697–708. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.079>

Parker, H.G., Kim, L.V., Sutter, N.B., Carlson, S., Lorentzen, T.D., Malek, T.B., Johnson, G.S., DeFrance, H.B., Ostrander, E.A., Kruglyak, L. (2004). Genetic structure of the purebred domestic dog. *science* 304, 1160–1164.

Parker, H.G., Kukekova, A.V., Akey, D.T., Goldstein, O., Kirkness, E.F., Baysac, K.C., Mosher, D.S., Aguirre, G.D., Aclet, G.M., Ostrander, E.A. (2007). Breed relationships facilitate fine-mapping studies: a 7.8-kb deletion cosegregates with Collie eye anomaly across multiple dog breeds. *Genome Res.* 17, 1562–1571.

Plassais, J., Guaguère, E., Lagoutte, L., Guillory, A.-S., de Citres, C.D., Degorce-Rubiales, F., Delverdier, M., Vaysse, A., Quignon, P., Bleuart, C., Hitte, C., Fautrel, A., Kaerle, C., Bellaud, P., Bensignor, E., Queney, G., Bourrat, E., Thomas, A., André, C. (2015). A spontaneous KRT16 mutation in a dog breed: a model for human focal non-epidermolytic palmoplantar keratoderma (FNEP-PK). *J. Invest. Dermatol.* 135, 1187–1190. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.526>.

Plassais, J., Kim, J., Davis, B.W., Karyadi, D.M., Hogan, A.N., Harris, A.C., Decker, B., Parker, H.G., Ostrander, E.A. (2019). Whole genome sequencing of canids reveals genomic regions under selection et variants influencing morphology. *Nat. Commun.* 10, 1–14.

Plassais, J., Lagoutte, L., Correard, S., Paradis, M., Guaguère, E., Hédan, B., Pommier, A., Botherel, N., Cadiegues, M.-C., Pilorge, P., Silversides, D., Bizot, M., Samuels, M., Arnan, C., Johnson, R., Hitte, C., Salbert, G., Méreau, A., Quignon, P., Derrien, T., André, C. (2016). A Point Mutation in a lincRNA Upstream of GDNF Is Associated to a Canine Insensitivity to Pain: A Spontaneous Model for Human Sensory Neuropathies. *PLoS Genet.* 12, e1006482. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006482>.

Ulvé, R., Rault, M., Bahin, M., Lagoutte, L., Abadie, J., De Brito, C., Coindre, J.-M., Botherel, N., Rousseau, A., Wucher, V., Cadieu, E., Thieblemont, C., Hitte, C., Cornevin, L., Cabillic, F., Bachelot, L., Gilot, D., Hennuy, B., Guillaudeux, T., Le Goff, A., Derrien, T., Hédan, B., André, C. (2017). Discovery of Human-Similar Gene Fusions in Canine Cancers. *Cancer Res.* 77, 5721–5727. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2691>.

Vaysse, A., Ratnakumar, A., Derrien, T., Axelsson, E., Rosengren Pielberg, G., Sigurdsson, S., Fall, T., Seppälä, E.H., Hansen, M.S.T., Lawley, C.T., Karlsson, E.K., LUPA Consortium, Bannasch, D., Vilà, C., Lohi, H., Galibert, F., Fredholm, M., Häggström, J., Hedhammar, A., André, C., Lindblad-Toh, K., Hitte, C., Webster, M.T. (2011). Identification of genomic regions associated with phenotypic variation between dog breeds using selection mapping. *PLoS Genet.* 7, e1002316. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002316>.

Vonholdt, B.M., Pollinger, J.P., Lohmueller, K.E., Han, E., Parker, H.G., Quignon, P., Degenhardt, J.D., Boyko, A.R., Earl, D.A., Auton, A., Reynolds, A., Bryc, K., Brisbin, A., Knowles, J.C., Mosher, D.S., Spady, T.C., Elkhoulou, A., Geffen, E., Pilot, M., Jedrzejewski, W., Greco, C., Reti, E., Bannasch, D., Wilton, A., Shearman, J., Musiani, M., Cargill, M., Jones, P.G., Qian, Z., Huang, W., Ding, Z.-L., Zhang, Y.-P., Bustamante, C.D., Ostrander, E.A., Novembre, J., Wayne, R.K. (2010). Genome-wide SNP et haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* 464, 898–902. <https://doi.org/10.1038/nature08837>.

Wang, C., Wallerman, O., Arendt, M.-L., Sundström, E., Karlsson, Å., Nordin, J., Mäkeläinen, S., Pielberg, G.R., Hanson, J., Ohlsson, Å., Saellström, S., Rönnerberg, H., Ljungvall, I., Häggström, J., Bergström, T.F., Hedhammar, Å., Meadows, J.R.S., Lindblad-Toh, K. (2021). A novel canine reference genome resolves genomic architecture et uncovers transcript complexity. *Commun. Biol.* 4, 185. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01698-x>.

Wucher, V., Legeai, F., Hédan, B., Rizk, G., Lagoutte, L., Leeb, T., Jagannathan, V., Cadieu, E., David, A., Lohi, H., Cirera, S., Fredholm, M., Botherel, N., Leegwater, P.A.J., Le Béguec, C., Fieten, H., Johnson, J., Alföldi, J., André, C., Lindblad-Toh, K., Hitte, C., Derrien, T. (2017). FEELnc: a tool for long non-coding RNA annotation et its application to the dog transcriptome. *Nucleic Acids Res.* 45, e57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1306>.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue «NOV'AE», la date de sa publication et son URL.

Conserver les communautés microbiennes associées aux plantes viables et fonctionnelles : premiers résultats

Missimahou OUSSOU¹
Géraldine TAGHOUTI¹
Steven JAGLINE¹
Thomas LERENARD¹
Audrey LATHUS¹
Cécile DUTRIEUX¹
Perrine PORTIER¹

CORRESPONDANCE
perrine.portier@inrae.fr

RÉSUMÉ

Les microbiotes qui vivent en association avec l'ensemble des êtres vivants présentent un important intérêt en agriculture, notamment pour l'amélioration de la santé des plantes. Cependant, leur manipulation demande à pouvoir préserver ces communautés vivantes et fonctionnelles. Préserver ces communautés de façon efficace n'est pas simple, celles-ci étant composées d'une très grande diversité de microorganismes que, pour beaucoup, nous ne savons cultiver.

À la Collection Française des Bactéries associées aux Plantes, CIRM-CFBP, basée à INRAE Angers, nous avons mis en place le projet MICROSTORE, financé par le département Santé des Plantes et Environnement d'INRAE. L'objectif de ce projet, actuellement en cours, est de mesurer l'impact de la conservation de microbiotes associés aux feuilles et aux graines de radis ainsi que l'impact d'une étape d'amplification biologique après conservation.. Nous avons, avant et après conservation pendant deux ans, mesuré la composition taxonomique (par barcoding) et la diversité fonctionnelle (par technologie Biolog) pour chaque microbiote. L'analyse des données est en cours de finalisation, cependant, les données recueillies nous livrent déjà des informations précises sur l'effet de la conservation et sur l'effet d'une étape d'amplification biologique après conservation sur les microbiotes associés aux plantes. À terme, ces travaux devraient fournir aux scientifiques des outils pour mieux préserver ce type de ressources biologiques.

MOTS-CLÉS

Communautés microbiennes, plantes et semences, Centre de Ressources Biologiques, conservation.

¹ Université d'Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, CIRM-CFBP, F-49000 Angers, France.

Preservation of viable and functional plant-associated microbial communities: first results

Missimahou OUSSOU¹
Géraldine TAGHOUTI¹
Steven JAGLINE¹
Thomas LERENARD¹
Audrey LATHUS¹
Cécile DUTRIEUX¹
Perrine PORTIER¹

CORRESPONDENCE
perrine.portier@inrae.fr

ABSTRACT

Microbiota are communities of microorganisms living associated with all living beings. They are of a great interest in agriculture, including to enhance plant health. However, their handling requires to preserve them alive and functioning on a long-term basis.

Reliable preservation of these communities is not simple, because they are composed of a great diversity of microorganisms, some of them we do not know how to cultivate.

At the French Collection for Plant-associated Bacteria (CIRM-CFBP) located at INRAE Angers, we proposed to measure the impact of the preservation on microbiota associated with radish leaves and seeds. We measured the impact of preservation on the taxonomic diversity (by barcoding) and the functional diversity (by Biolog technology) of these microbiotas before and after preservation for two years. This work enhances knowledge of the influence of preservation and of a multiplication stage after preservation. It will permit to make tools available to scientists enhancing the preservation of these resources.

KEYWORDS

Microbial communities, plant and seeds, Biological Resource Center, preservation.

¹ Université d'Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, CIRM-CFBP, F-49000 Angers, France.

Introduction

Les microbiotes qui vivent en association avec l'ensemble des êtres vivants présentent un important intérêt en agriculture, notamment pour l'amélioration de la santé des plantes ; ceci sous condition de préserver ces communautés vivantes et fonctionnelles pendant leur manipulation. Or, préserver ces communautés de façon efficace n'est pas simple, car elles sont composées d'une très grande diversité de microorganismes que, pour beaucoup, nous ne savons pas cultiver.

S'il existe des études sur la conservation, elles portent pour beaucoup sur le microbiote humain (Kerckhof et al., 2014 ; Fouhy et al., 2015 ; Gacy et al., 2017), même si on peut trouver quelques données pour des microbiotes du sol (Richaume et al., 2006) ou encore des co-cultures méthanotrophiques ou des biofilms de stations d'épuration (Kerckhof et al., 2014). En revanche, aucune publication à ce jour ne fait état de la conservation des microbiotes de plantes, ni ne permet de répondre aux questions spécifiques à cette conservation. L'utilisation, parfois, d'étapes d'amplification en fermenteur ne permet pas une comparaison stricte entre un état initial et un état d'après conservation. De plus, les données acquises concernant les capacités métaboliques sont très ciblées et ne permettent pas d'avoir une idée globale de la façon dont réagit un microbiote à la conservation.

À la Collection Française des Bactéries associées aux Plantes, CIRM-CFBP, basée à INRAE Angers, nous avons mis en place, en 2019, le projet MICROS-TORE, financé par le département Santé des Plantes et Environnement d'INRAE. L'objectif de ce projet, actuellement en cours, est de mesurer l'impact de la conservation de microbiotes associés aux feuilles et aux graines de radis ainsi que celui d'une étape d'amplification biologique après conservation.

En pratique, nous avons extrait deux microbiotes de semences de radis et deux microbiotes de feuilles de radis cultivés à partir de ce même lot. Nous avons aussi construit une communauté synthétique (Syn-Com) à partir de 10 souches bactériennes isolées de semences de radis et de haricot afin de servir de point de référence. Les microbiotes ont ensuite été conservés pendant 2 ans selon 3 modalités : lyophilisées, cryoconservées en glycérol à -80 °C en congélateur ou à -196 °C dans l'azote liquide. Pour chaque microbiote, nous avons mesuré, avant et après conser-

vation, la composition taxonomique (par barcoding) et la diversité fonctionnelle (par technologie Biolog).

Nous livrons ici les premiers résultats issus de ces travaux, après une présentation des enjeux liés aux microbiotes de plantes ainsi qu'un état de l'art de la conservation du microbiote.

Enjeux liés aux microbiotes des plantes

À l'instar des animaux, les plantes vivent en association avec des communautés microbiennes, complexes (Muller et al., 2016). Les communautés microbiennes, ou microbiotes, sont définies comme un assemblage de microorganismes appartenant à différents règnes et interagissant les uns avec les autres dans un environnement contigu (Berg et al., 2020). Ces communautés peuvent remplir plusieurs rôles pour la plante. Ainsi, la composition du microbiote, présent dans le sol ou dans les racines, a un impact sur la croissance (Sugiyama et al., 2021) et sur la date de floraison (Pank-Buisse et al., 2015) chez *Arabidopsis thaliana*. Il a aussi été démontré que le microbiote joue un rôle dans la résistance du chou champêtre (*Brassica rapa*) au stress hydrique (Lau & Lennon, 2012), ou encore que, sous l'effet d'un stress hydrique, les microbiotes associés au riz sont modifiés, permettant une meilleure survie de la plante (Santos-Medellin et al., 2017). D'une manière générale, les microbiotes végétaux sont impliqués dans la résistance à différents stress abiotiques : inondation, sécheresse, carence en azote et phosphore (Hartman & Tringe, 2019).

Les microbiotes végétaux jouent aussi un rôle dans la réponse des plantes aux pathogènes et dans la transmission de ces pathogènes par les semences. Certains pathogènes sont, en effet, transmis par les semences (qui constituent alors une source d'inoculum primaire), et sont transmis à la plantule lors de la germination. La composition du microbiote peut influencer cette transmission (Barret et al., 2016). Ainsi, une forte compétition pour les ressources a été observée entre *Xanthomonas campestris*, pathogène des Brassicacées, et deux souches bactériennes appartenant à l'espèce *Stenotrophomonas rhizophila* issues du microbiote de graines de radis, suggérant que des constituants du microbiote des semences pourraient entrer en compétition avec des pathogènes et ainsi limiter leur transmission par les semences (Torres-Cortès et al., 2019). De même, l'effet suppressif de certains sols vis-à-vis de maladies microbiennes est conféré par les microorganismes du sol. Par exemple, des communautés microbiennes protègent les betteraves sucrières contre le pathogène fongique racinaire *Rhizoctonia solani* (Mendes et al., 2011), ou encore, une flavobac-

térie a été décrite comme protégeant les tomates contre l'infection par *Ralstonia solanacearum* (Kwak et al., 2018).

Au-delà de ces effets directs de protection contre les maladies, le microbiote étendrait l'immunité des plantes via un amorçage des défenses des plantes, et agirait comme une couche supplémentaire de défense contre les organismes pathogènes (Teixera et al., 2019). Selon McLaren & Callahan (2020), la résistance aux pathogènes pourrait même être le principal avantage évolutif issu du microbiote chez les plantes.

L'utilisation de microbiotes natifs ou de communautés synthétiques (SynCom) permet ainsi d'aborder les causalités entre la composition des microbiotes et la résistance des plantes, ou de proposer des perspectives d'application.

L'utilisation de communautés synthétiques se focalise sur l'utilisation de microorganismes particuliers ou de taxons clés qui peuvent fournir des nutriments indispensables, une résistance à un pathogène ou promouvoir des fonctions microbiennes (Qiu et al., 2019). Ces SynCom peuvent également servir de modèle pour étudier les mécanismes d'assemblage du microbiote végétal (Ishizawa et al., 2020). Par exemple, une Syncom assemblée à partir de souches de la rhizosphère de canne à sucre a montré qu'elle pouvait améliorer la croissance du maïs (Armanhi et al., 2017), ou encore un assemblage de sept souches bactériennes permet de protéger le maïs contre l'infection par *Fusarium verticillioides* (Niu et al., 2017). Cependant, même si des efforts ont été faits en ce sens (Lewis et al., 2020), il n'est pas possible d'isoler l'ensemble des membres des microbiotes, une bonne partie d'entre eux n'étant pas cultivables, et de les utiliser dans des SynCom. Celles-ci ne sont donc pas représentatives d'un microbiote natif complexe.

À l'inverse, les communautés naturelles présentent l'avantage d'être composées de la totalité du microbiote. Celles-ci sont d'ailleurs déjà utilisées en santé humaine ou vétérinaire avec succès (exemple de la transplantation fécale ; Wang et al., 2019 ; Pereira et al., 2018).

Il existe cependant une limite à l'emploi des communautés natives, c'est celle de leur conservation. En effet, leur utilisation se fait à partir soit de communautés fraîches, soit de portions de matière les contenant. Il n'existe pas de méthode établie de conservation de ces communautés en dehors de la matière dans laquelle elles se trouvent. D'autre part, chez la plante, il n'existe pas d'études sur l'utilisation de microbiotes natifs, et quasiment aucune sur leur conservation, alors que

plusieurs études tendent à les proposer comme solutions de lutte contre les pathogènes de plante. Il y a donc un enjeu important à pouvoir stocker ces microbiotes et préserver leur viabilité pour des études et utilisations ultérieures.

La conservation des communautés microbiennes vivantes : état de l'art

Les microbiotes sont très diversifiés et sont constitués d'une part non négligeable d'organismes non cultivables en laboratoire. Ainsi, dans la phyllosphère d'*Arabidopsis thaliana* seulement 60 % des microorganismes sont cultivables (Bai et al., 2015).

La conservation appliquée à ces communautés, afin de les garder vivantes, aura donc un effet différentiel sur la survie des différents organismes qui les composent et, par conséquent, un impact sur la diversité taxonomique de ces communautés. En conséquence, cette modification de la composition taxonomique induite par la conservation pourra aussi avoir un impact sur la diversité fonctionnelle des communautés conservées.

À ce jour, les études sur la conservation portent pour beaucoup sur le microbiote humain (Kerckhof et al., 2014 ; Fouhy et al., 2015 ; Gacy et al., 2017) même si on peut trouver quelques données pour des microbiotes du sol (Richaume et al., 2006) ou encore des co-cultures méthanotrophiques ou des biofilms de stations d'épuration (Kerckhof et al., 2014).

Ces études sont assez diverses tant par leur mise en place que par leurs résultats.

Les modes de conservation étudiés sont la congélation à -80° C ou la lyophilisation, parfois après une étape d'amplification en fermenteur. La composition taxonomique est analysée par métabarcoding 16S, par puce à ADN spécifique des familles bactériennes du microbiote humain, ou par RISA (Ribosomal RNA intergenic spacer analysis, méthode d'analyse basée sur les régions inter-géniques de l'ARNr qui évite les biais liés aux étapes de culture). Les capacités métaboliques sont souvent non évaluées ou portent sur des activités spécifiques (production de gaz et acides gras à chaînes courtes, quantification de la biomasse, des nitrites et des gaz produits, respiration sur glucose et capacité à transformer des substrats cibles).

Les résultats de ces études aussi sont divergents. Ainsi, Fouhy et al. (2014) concluent à une absence de modification de la composition taxonomique du microbiote intestinal humain après 7 jours de conservation ; mais on peut se demander si cela n'est pas biaisé par le fait que la méthode de métabarcoding analyse l'ADN

des cellules, qu'elles soient viables ou pas. Pour cette étude, seule la viabilité des microbiotes a été évaluée mais pas leurs capacités métaboliques.

Par contre, Gacy et al. (2017), toujours pour le microbiote intestinal humain, et après une étape d'amplification en fermenteur, concluent que la conservation induit des modifications de la composition taxonomique des communautés.

Kerckhof et al. (2014) ont étudié simultanément trois communautés très différentes. Ils concluent que la composition taxonomique après conservation est altérée, même si la structure générale des communautés est inchangée.

Enfin, Richaume et al. (2006) indiquent, qu'après 15 ou 30 jours de conservation, des changements dans la composition taxonomique ou les capacités métaboliques sont observables.

Matériels et méthodes

Le CIRM-CFBP, Collection Française des Bactéries associées aux Plantes (membre du pilier microbien de RARe : <https://cirm-cfbp.fr/>) préserve, depuis près de 50 ans, des ressources bactériennes stratégiques pour la santé des plantes. Au CIRM-CFBP, les bactéries sont préservées sous 3 modalités : lyophilisées, cryoconservées en glycérol à -80° C en congélateur ou à -196° C dans l'azote liquide.

Nous avons proposé d'appliquer ces trois modes de préservation, que nous maîtrisons, à des microbiotes issus de plantes, et d'évaluer leur composition taxo-

nomique en bactéries et champignons et leur diversité fonctionnelle avant et après deux années de conservation.

En pratique, nous avons extrait deux microbiotes de semences de radis et deux microbiotes de feuilles de radis cultivés à partir de ce même lot. Nous avons aussi construit une communauté synthétique (SynCom) à partir de 10 souches bactériennes isolées de semences de radis et de haricot afin de servir de point de référence.

La composition taxonomique des microbiotes a été analysée par métabarcoding des marqueurs 16S, ITS1 et gyrB (Barret et al., 2015). Le marqueur 16S permet d'identifier les grandes familles bactériennes, le marqueur ITS1 est spécifique des champignons et le marqueur gyrB permet d'avoir une résolution taxonomique plus fine pour les membres des protéobactéries.

La diversité fonctionnelle a été évaluée par la technologie Biolog. Cette technologie est basée sur l'utilisation de plaques, dont chaque puits comporte un substrat unique, et la visualisation par indicateur coloré. Les plaques sont inoculées avec une souche de microorganisme ou une communauté en suspension. Si les organismes placés dans le puits sont en capacité de métaboliser le substrat, cela induit une respiration cellulaire et la production de NADH, ce qui se traduit par la réduction du Tétrazolium incolore en Formazan de couleur violette. Ainsi, cette méthode permet de quantifier la respiration liée à la métabolisation du substrat. Différents types de plaques sont commercialisés par

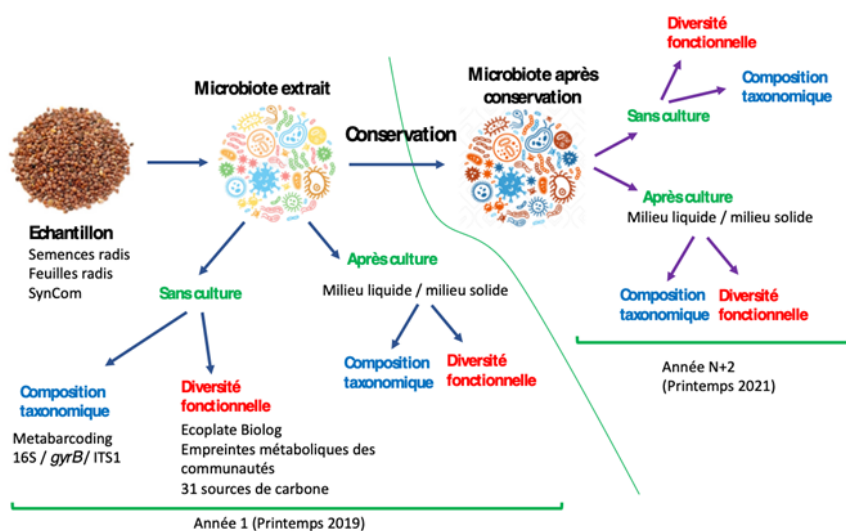


Figure 1. Plan expérimental du projet Microstore. La composition taxonomique et la diversité fonctionnelle de deux microbiotes de semences de radis, de deux microbiotes de feuilles de radis (cultivées à partir du même lot de semences) et d'une communauté synthétique (SynCom) sont mesurées avant et après conservation (lyophilisation, cryopréservation à -80 °C ou -196 °C), avant et après une étape d'amplification biologique sur milieu solide ou en milieu liquide.

Biolog. Nous avons utilisé les plaques Ecoplates selon les spécifications du fournisseur. Celles-ci, spécifiquement conçues pour mesurer les empreintes métaboliques des communautés microbiennes, comportent 31 sources de carbone en triplicat (6 acides aminés, 2 amines, 10 glucides, 7 acides carboxyliques, 2 composés phénoliques et 4 polymères). L'acquisition des données s'est faite dans un appareil Omnilog permettant une acquisition à haut débit (jusque 50 plaques). La composition taxonomique et la diversité fonctionnelle ont été analysées, pour chaque microbiote, avant et après conservation, et avec ou non une étape d'amplification en milieu solide (Tryptic Soy Agar 10 %, 4 jours) ou en milieu liquide (Tryptic Soy Broth 10 %, 24h). Cette étape d'amplification par culture a été testée, car une utilisation des microbiotes dans un domaine appliqué nécessitera probablement d'amplifier le matériel biologique. Or, cette culture induit, elle aussi, des biais qui s'ajoutent à ceux induits par la seule conservation. La comparaison avant/après conservation et avec/sans culture permettra de mieux appréhender le rôle de chacune de ces étapes. Le plan expérimental est présenté dans la figure 1. Les expérimentations ont été menées, pour les étapes avant conservation au printemps 2019, et pour les étapes après conservation au printemps 2021.

Résultats préliminaires et analyse

L'analyse des données est en cours de finalisation et donnera lieu à une publication.

Cependant, les premiers résultats nous permettent déjà de tirer quelques conclusions.

L'analyse de la diversité taxonomique **avant conservation** indique que celle-ci est plus élevée dans les feuilles de radis que dans les semences. Ceci avait déjà été démontré pour l'épinard (Lopez-Velasco et al., 2013). De plus, après une étape de culture, la diversité diminue fortement (Figure 2).

La diversité fonctionnelle est, par contre, peu impactée par les étapes de culture appliquées **avant la conservation**. On observe plus de différences entre les différents types de microbiotes (SynCom, graine ou feuille) que dues aux étapes de culture (Figure 3). Les microbiotes de feuilles se distinguent par leur capacité à métaboliser le glycogène (capacité absente chez les autres microbiotes).

Nous avons également comparé l'empreinte métabolique de la communauté synthétique à celle de chaque souche prise individuellement (Figure 4).

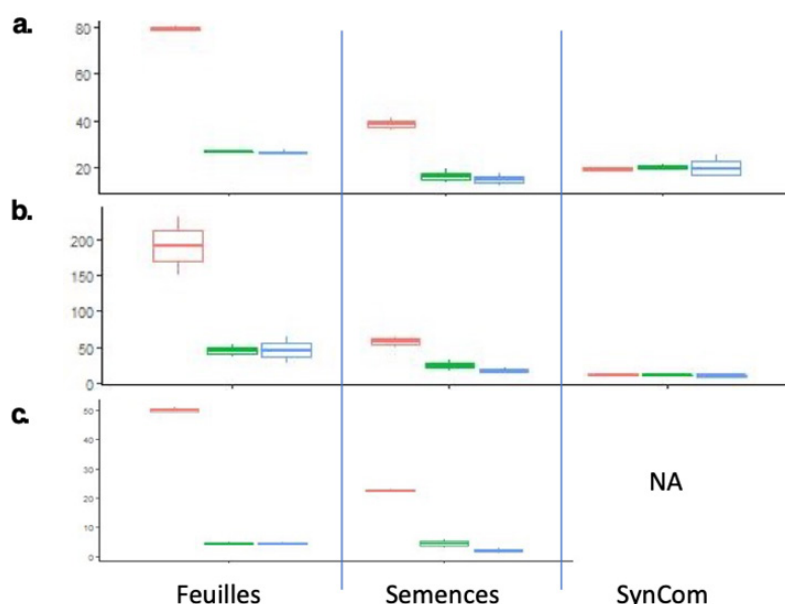


Figure 2. Alpha-diversité (= richesse spécifique) dans les microbiotes de feuille, semences et communauté synthétique (SynCom) avant conservation, mesurée par métabarcoding avec les marqueurs 16S, gyrB et ITS1.

a : 16S, b : gyrB, c : ITS1. En rouge : sans étape de culture. En vert : après une étape de culture en milieu liquide. En bleu : après une étape de culture en milieu solide.

NA : Non Applicable

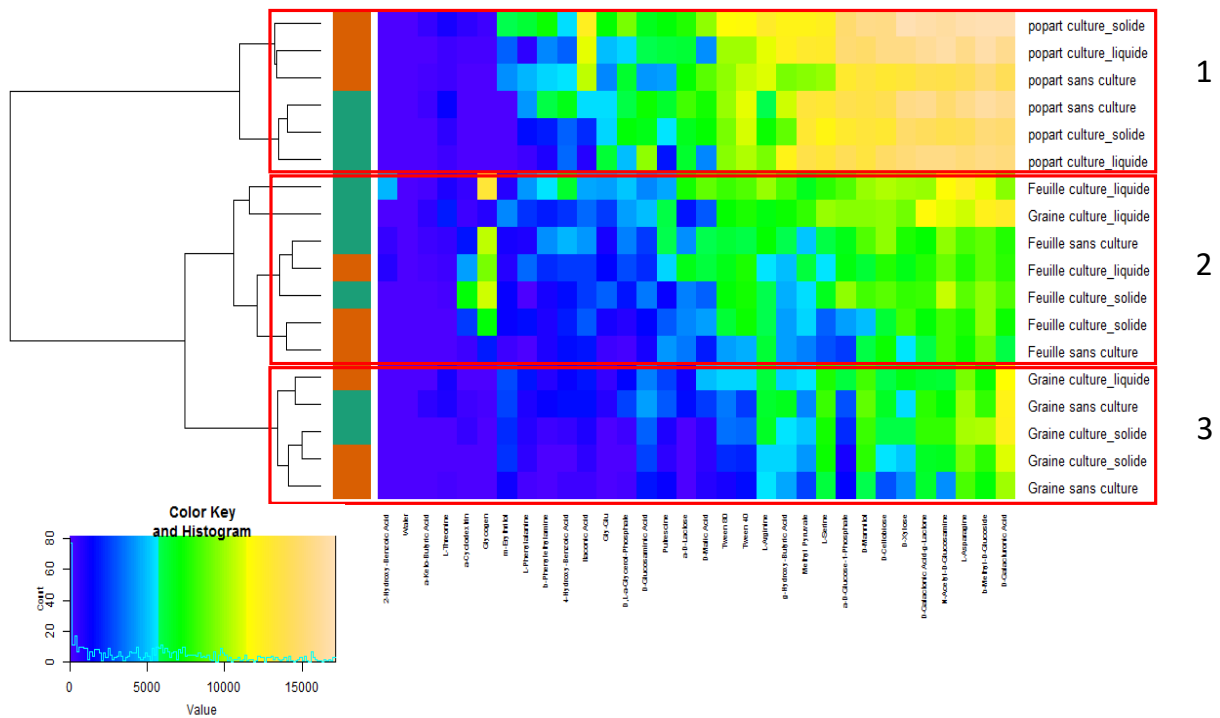


Figure 3. Intensité de métabolisation des 31 substrats présents sur les plaques Ecoplates, avant conservation. L'intensité varie du bleu (non métabolisé) au beige (métabolisation complète). Le Cluster 1 regroupe les communautés synthétiques, le cluster 2 regroupe les microbiotes de feuilles (+ un des microbiotes de semences) et le cluster 3 regroupe les microbiotes de semences. Il n'y a pas de clusterisation en fonction de l'application ou non d'une étape de culture avant conservation.

Composés	13502	13505	13507	13508	13511	13513	13530	13571	13575	13603	SynCom 1	SynCom 2
Eau (témoin -)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b-Methyl-D-Glucoside	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
D-Galactonic_Acid-g-Lactone	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
L-Arginine	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Methyl_Pyruvate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Galacturonic_Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Asparagine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween_40	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
m-Erythritol	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
2-Hydroxy-Benzoic_Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Phenylalanine	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Tween_80	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
4-Hydroxy-Butyric_Acid	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
L-Serine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
a-Cyclodextrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
g-Hydroxy-Butyric_Acid	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
L-Threonine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucosaminic_Acid	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
Itaconic_Acid	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Gly-Glu	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
D-Cellulose	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
a-D-Glucose-1-Phosphate	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
a-Keto-Butyric_Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b-Phenylethylamine	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
a-D-Lactose	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
D,L-a-Glycerol-Phosphate	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
D-Malic_Acid	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Putrescine	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+

Figure 4. Empreinte métabolique de la communauté synthétique (en dupliqué) et des souches individuelles qui la composent. Chaque case verte représente une réaction positive.

La diversité fonctionnelle des communautés synthétiques est supérieure à celle des souches individuelles. Nous n'observons pas d'émergence de capacités, chacune est présente au moins chez une souche et, de même, nous n'observons pas de phénomène d'inhibition. Un composé (m-Erythritol) présente une réaction variable entre les deux répétitions pour la communauté synthétique.

Après conservation, on observe un effet significatif des étapes de culture sur la diversité taxonomique ; par contre, la conservation elle-même n'a pas d'effet significatif. Cela pourrait être dû à la persistance de l'ADN dans le milieu même après la perte de viabilité des organismes. Pour la diversité fonctionnelle en revanche, la conservation a un impact significatif, mais pas les étapes de cultures appliquées en sortie de conservation.

Conclusion

L'objectif du projet MICROSTORE est mesurer l'impact de la conservation de microbiotes associés aux feuilles et aux graines de radis. L'analyse des données est en cours de finalisation, cependant, les données recueillies nous livrent déjà des informations précises sur l'effet de la conservation et sur l'effet d'une étape d'amplification biologique après conservation sur les microbiotes associés aux plantes.

À partir de ces travaux, il reste à déterminer quelle méthode de conservation est la mieux adaptée pour optimiser la conservation de ces communautés.

Ces résultats permettront rapidement de proposer des outils, aux scientifiques du domaine, pour optimiser la préservation de leurs microbiotes d'intérêt. ■

Remerciements

Un grand merci à Marie Simonin, Gilles Hunault et Matthieu Barret pour leur aide précieuse pour les analyses et leurs suggestions tout au long de ce projet.

Financement

Projet Microstore 2019-2021, département SPE INRAE.

Références

Armanhi J.S.L., Souza R.S.C. de, Damasceno N. de B., Araújo L.M. de, Imperial J. and Arruda P (2017). A Community-Based Culture Collection for Targeting Novel Plant Growth-Promoting Bacteria from the Sugarcane Microbiome. *Front Plant Sci*, 8, 2191.

Bai Y., Müller D. B., Srinivas G., Garrido-Oter R., Potthoff E., Rott M., Dombrowski N., Münch P.C., Spaepen S., Remus-Emsermann M., Hüttel B., McHardy A.C., Vorholt J.A. and Schulze-Lefert P. (2015). Functional overlap of the Arabidopsis leaf and root microbiota. *Nature* 2015 Vol. 528. Pages 364.

Barret M, Briand M, Bonneau S, Prévieux A, Valière S, Bouchez O, Hunault G, Simoneau P, Jacques MA (2015) Emergence shapes the structure of the seed-microbiota. *Appl. Environ. Microbiol* 81 (4) : 1257-1266

Barret M., Guimbaud J., Darrasse A. and Jacques M. (2016). Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. *Mol Plant Pathol*, 17, 791-795.

Berg G., Rybakova D., Fischer D. et al. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8, 103.

Fouhy F, Deane J, Rea MC, O'Sullivan Ó, Ross RP, O'Callaghan G, Plant BJ, Stanton C. (2015). The Effects of Freezing on Faecal Microbiota as Determined Using MiSeq Sequencing and Culture-Based Investigations (J Neu, Ed.). *PLOS ONE* 10, e0119355.

- Gaci N, Chaudhary PP, Tottey W, Alric M, Brugère J-F. (2017). Functional amplification and preservation of human gut microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease* 28, 1308070.
- Ishizawa H., Tada M., Kuroda M., Inoue D., Futamata H. and Ike M. (2020). Synthetic Bacterial Community of Duckweed: A Simple and Stable System to Study Plant-microbe Interactions. *Microbes Environ*, 35.
- Kerckhof F-M, Courtens ENP, Geirnaert A et al. (2014). Optimized Cryopreservation of Mixed Microbial Communities for Conserved Functionality and Diversity (K McCluskey, Ed.). *PLoS ONE* 9, e99517.
- Kwak M.-J., Kong H.G., Choi K. et al. (2018). Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *Nature Biotechnology*, 36, 1100–1109.
- Lau J.A. and Lennon J.T. (2012). Rapid responses of soil microorganisms improve plant fitness in novel environments. *PNAS*, 109, 14058–14062.
- Lewis W.H., Tahon G., Geesink P., Sousa D.Z. and Ettema T.J.G. (2020). Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nat Rev Microbiol*.
- Lopez-Velasco G., Carder P.A., Welbaum G.E. and Ponder M.A. (2013). Diversity of the spinach (*Spinacia oleracea*) spermosphere and phyllosphere bacterial communities. *FEMS Microbiol Lett*, 346, 146–154.
- McLaren M.R. and Callahan B.J. (2020). Pathogen resistance may be the principal evolutionary advantage provided by the microbiome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375, 20190592.
- Mendes R., Kruijt M., Bruijn I. de et al. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332, 1097–1100.
- Müller D.B., Vogel C., Bai Y. and Vorholt J.A. (2016). The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annu Rev Genet*, 50, 211–234.
- Niu B., Paulson J.N., Zheng X. and Kolter R. (2017). Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E2450–E2459.
- Pereira G.Q., Gomes L.A., Santos I.S., Alfieri A.F., Weese J.S. and Costa M.C. (2018). Fecal microbiota transplantation in puppies with canine parvovirus infection. *J Vet Intern Med*, 32, 707–711.
- Qiu Z., Egidi E., Liu H., Kaur S. and Singh B.K. (2019). New frontiers in agriculture productivity: Optimised microbial inoculants and in situ microbiome engineering. *Biotechnology Advances*, 37, 107371.
- Richaume A, Pourcelot A, Rama R, Nazaret S. (2006). Évaluation des modifications quantitatives, qualitatives et fonctionnelles induites par la conservation de consortiums bactériens extraits de sols., 19, *Les Actes du BRG*, 6, 371–389.
- Santos-Medellin C., Edwards J., Liechty Z., Nguyen B. and Sundaresan V. (2017). Drought Stress Results in a Compartment-Specific Restructuring of the Rice Root-Associated Microbiomes. *mBio*, 8.
- Sharma R., Nimonkar, Y., Sharma A., Rathore R.S. and Prakash O. (2018). Concept of Microbial Preservation: Past, Present and Future. In S. K. Sharma and A. Varma, eds. *Microbial Resource Conservation: Conventional to Modern Approaches*. Soil Biology, Cham: Springer International Publishing, pp. 35–54.
- Sugiyama A, Bakker M.G., Badri D.V., Manter D.K., Vivanco J.M. (2013). Relationships between *Arabidopsis* genotype-specific biomass accumulation and associated soil microbial communities. *Botany* 91: 123–12
- Teixeira P.J.P., Colaianni N.R., Fitzpatrick C.R. and Dangl J.L. (2019). Beyond pathogens: microbiota interactions with the plant immune system. *Curr Opin Microbiol*, 49, 7–17.
- Torres-Cortès G., Garcia B.J., Compant S. et al. (2019). Differences in resource use lead to coexistence of seed-transmitted microbial populations. *Sci Rep*, 9, 6648.
- Wang J.-W., Kuo C.-H., Kuo F.-C. et al. (2019). Fecal microbiota transplantation: Review and update. *J Formos Med Assoc*, 118 Suppl 1, S23–S31.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

La cryoconservation des cellules germinales souches chez la truite arc-en-ciel : une stratégie pour restaurer l'intégralité d'un génotype d'intérêt

Anne-Sophie GOUPIL¹
Stéphanie KICA¹
Tina TERRENNE²
Lionel GOARDON²
Alexandra DEPINCÉ¹
Charlène LABESSE¹
Jean-Jacques LAREYRE¹
Catherine LABBÉ¹

CORRESPONDANCE

catherine.labbe@inrae.fr

jean-jacques.lareyre@inrae.fr

RÉSUMÉ

La conservation en cryobanque des ressources génétiques chez les poissons repose uniquement sur la cryoconservation du sperme, puisque la cryoconservation des ovules et des embryons chez ces espèces à œufs téolécithes est toujours impossible. Pour autant, la cryoconservation des cellules germinales souches est envisageable. On sait, par ailleurs, que des cellules germinales souches injectées dans la cavité abdominale d'alevins receveurs intégraient leurs gonades et conduisaient in fine à la production de gamètes fonctionnels. Dans le cadre de la mise en place de l'infrastructure CRB Anim, pilier animal de RARe, une méthode de cryoconservation des cellules germinales souches a été mise au point chez la truite arc-en-ciel. Nous présentons et commentons ici la méthode retenue : le recours aux protéines d'origine animale dans le dilueur a été évité, la qualité des cellules décongelées a été validée et leur capacité à coloniser les gonades d'alevins receveurs a été démontrée. La stratégie de cryoconservation décrite permet l'entrée en cryobanque d'un matériel biologique qui assure la restauration de l'intégralité d'un génotype d'intérêt après cryoconservation chez les poissons.

MOTS-CLÉS

Cryobanque, ressources génétiques, *Oncorhynchus mykiss*, poissons.

1 INRAE, Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons LPGP, UR1037, 35 000 Rennes.

2 INRAE, UE PEIMA, 29450 Sizun.

Ce travail a été initié et encouragé par Florence Le Gac, décédée le 9 juillet 2018 alors que les premiers succès de greffe après cryoconservation étaient validés.

Cryopreservation of germinal stem cells in rainbow trout: a strategy to entirely restore a genotype of interest

Anne-Sophie GOUPIL¹
Stéphanie KICA¹
Tina TERRENNE²
Lionel GOARDON²
Alexandra DEPINCÉ¹
Charlène LABESSE¹
Jean-Jacques LAREYRE¹
Catherine LABBÉ²

CORRESPONDENCE

catherine.labbe@inrae.fr

jean-jacques.lareyre@inrae.fr

ABSTRACT

Cryobanking of fish genetic resources relies exclusively on sperm cryopreservation, as the cryopreservation of oocytes and embryos is not possible in these species with telolecithal eggs. However, the cryopreservation of germinal stem cells is achievable, because they are structurally less complex than fish oocytes and embryos. In addition, it is shown that when germinal stem cells are injected into the peritoneal cavity of recipient fries, they colonize the fry gonads and undergo gametogenesis, thereby leading to the production of functional gametes. In the course of building the infrastructure of BRC Anim, the animal component of the AgroBRC/RARe infrastructure, a method for germinal stem cell cryopreservation was set up for rainbow trout. Here, we present and comment the final procedure that was adopted: the extenders were devoid of animal products, thawed cell quality was validated, and their ability to colonize recipient gonads was demonstrated. The cryopreservation strategy described enables the cryobanking of biological materials that support the regeneration of a complete genotype of interest after cryopreservation in fish.

KEYWORDS

Cryobank, Genetic resources, *Oncorhynchus mykiss*, Fish.

1 INRAE, Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons LPGP, UR1037, 35 000 Rennes.

2 INRAE, UE PEIMA, 29450 Sizun.

Ce travail a été initié et encouragé par Florence Le Gac, décédée le 9 juillet 2018 alors que les premiers succès de greffe après cryoconservation étaient validés.

Introduction

Chez les poissons, la cryoconservation du sperme est globalement maîtrisée chez les espèces d'intérêt aquacole et pour la recherche. Ce matériel biologique est donc désormais utilisé en routine pour conserver les ressources génétiques aquacoles, même si des améliorations sont encore recherchées ponctuellement. En France, la Cryobanque Nationale et ses partenaires aquacoles (INRAE, SYSAAF - syndicat des sélectionneurs avicoles et aquacoles français -) ont été à l'origine de la création d'une cryobanque centralisée, rassemblant la majorité des ressources génétiques aquacoles françaises sous forme de semence cryoconservée. Cependant, aucune méthode à l'heure actuelle ne permet de cryoconserver des ovules matures fonctionnels ou des embryons entiers chez les poissons, en raison de la présence d'un compartiment vitellin imperméable aux cryoprotecteurs, et dont la moindre perturbation affecte le développement embryonnaire (Martinez-Paramo et al., 2017). La régénération d'individus porteurs d'un génotype d'intérêt suppose donc de croiser le sperme cryoconservé avec des ovules frais de la même origine génétique, afin de produire les alevins attendus. Or, le maintien de la diversité génétique via les ovules frais, par conservation de cheptels femelles en pisciculture, est très lourd, coûteux et peu sûr sur le long terme. En l'absence de ces géniteurs, la régénération de la ressource génétique à partir du seul sperme cryoconservé, utilisé avec des ovules d'une origine génétique différente, ne permettra de restaurer que 50 % du génotype donneur à la première génération. De plus, le génome mitochondrial d'origine sera perdu, car il est transmis uniquement par voie maternelle.

Différentes biotechnologies visant à contourner cet écueil ont été développées ces 30 dernières années (Labbé et al., 2012 ; Labbé, 2013), dont l'androgénèse (injection de 1 ou 2 spermatozoïdes dans des ovules dont l'ADN a été inactivé), la greffe de cellules germinales souches embryonnaires

et adultes, et le transfert nucléaire (injection du noyau d'une cellule somatique dans un ovule dont l'ADN a été inactivé). Pour autant, beaucoup de ces technologies sont toujours au stade de la recherche ou bien offrent des rendements de succès ou de conformité génétique encore peu compatibles avec une utilisation en routine pour la conservation des ressources génétiques. L'une de ces méthodes, la greffe de cellules germinales souches adultes, s'avérait cependant particulièrement prometteuse d'après les succès rapportés par l'équipe japonaise du Dr. Goro Yoshizaki (Okutsu et al., 2006a). Le principe de cette technologie est schématisé dans la figure 1.

L'intérêt de la régénération d'une population par greffe de cellules germinales souches est que, quel que soit le génotype des individus greffés, les gamètes produits contiennent l'intégralité du génome présent dans les cellules cryoconservées. De plus, lors de l'ovogénèse d'une femelle greffée, les ovogonies formées porteront l'ADN mitochondrial de la cellule souche dont elles sont issues, et transmettront ce patrimoine mitochondrial à la descendance. Enfin, les cellules germinales souches étant de taille et de structure proches de celles de cellules somatiques, leur cryoconservation ne soulève pas les écueils rencontrés pour les ovules ou les embryons (Okutsu et al., 2007).

Les promesses portées par les cellules germinales souches adultes vis-à-vis de la conservation des ressources génétiques chez les poissons (Yoshizaki et al., 2011 ; Lacerda et al., 2013) nous ont conduits à explorer cette voie pour la rendre opérationnelle en cryobanque. Dans le cadre du Projet Investissements d'Avenir CRB Anim, qui a soutenu le développement du pilier animal de RARE, nous avons analysé le potentiel de différentes méthodes de cryoconservation, en orientant certaines stratégies pour s'adapter aux prérequis du CRB Cryobanque Nationale et de ses sites secondaires, membres de CRB-Anim. Cela inclut i) une possibilité de collecte à grande échelle du matériel biologique, par un personnel polyvalent, ii) la biosécurité du matériel conservé (élimination des produits d'origine

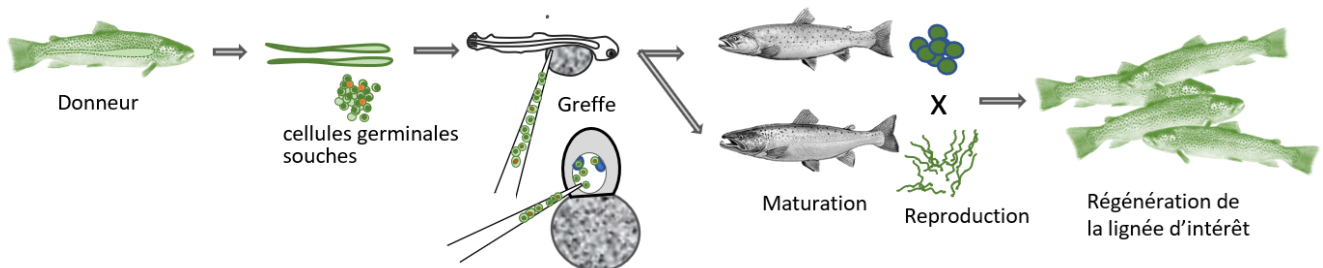


Figure 1. Principe de la greffe de cellules germinales souches (selon Okutsu et al., 2006a)

Les gonades de l'individu donneur adulte portant le génotype d'intérêt sont dissociées. La suspension cellulaire obtenue, contenant une petite proportion de cellules germinales souches (figurées en orange), est injectée dans la cavité abdominale (disque blanc) d'un alevin receveur. Les cellules germinales souches vont intégrer les gonades immatures du receveur (zones bleues), par un mécanisme encore mal connu, et initier la production de gamètes fonctionnels.

animale), iii) la compatibilité des contenants avec les espaces de stockage disponibles (paillettes notamment), et iv) la préservation du potentiel reproducteur des cellules germinales souches, c'est-à-dire leur capacité à coloniser les gonades d'alevins receveurs et à se différencier en gamètes fonctionnels. Ce travail a été réalisé chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), une espèce à fort intérêt économique en France et un modèle important pour la recherche aquacole, induisant la création de nombreuses lignées expérimentales.

Stratégie de cryoconservation et résultats

Choix des individus donneurs de cellules

Il a été montré que la greffe de cellules germinales souches testiculaires de mâles adultes pouvait logiquement conduire à la production de sperme, mais que ces cellules étaient aussi capables de se différencier en ovules si elles sont greffées dans un alevin femelle (Okutsu et al., 2006a). L'inverse est vrai pour les cellules germinales souches de l'ovaire de femelles adultes (Lee et al., 2016), ce qui prouve la bipotence de ce matériel biologique. Cette propriété est précieuse, car même si un seul sexe est disponible chez les individus donneurs pour la cryoconservation, du sperme ou des ovules pourront être obtenus dans tous les cas, en jouant sur le sexe des receveurs. Chez les espèces à déterminisme sexuel XY comme la truite arc-en-ciel, les cellules germinales souches testiculaires sont le premier matériel à considérer, car elles contiennent l'information génétique portée par le chromosome Y, contrairement aux ovogonies. Nos récentes observations indiquent, en outre, que le nombre de cellules germinales souches présentes dans un testicule de mâles adultes sexuellement immatures peut être jusqu'à 1 000 fois plus élevé, à poids de tissus équivalent, que dans un ovaire (Lareyre et al., communication personnelle). Il est aussi recommandé de travailler avec des individus adultes immatures, c'est à dire peu avancés dans leur gamétogénèse, afin de ne pas diluer les suspensions cellulaires avec d'autres cellules spermatiques ou des ovocytes vitellogéniques. Enfin, les cellules germinales souches adultes sont préférables aux cellules souches embryonnaires (ou PGCs pour primordial germ cells), qui possèdent pourtant les mêmes capacités de greffe (Takeuchi et al., 2004). En effet, les gonades adultes sont plus aisées à collecter par un opérateur non expérimenté que les fils translucides constituant les gonades embryonnaires. De

plus, les premières permettent d'obtenir plusieurs milliers de cellules souches à partir d'un individu (dans nos conditions), contre moins de 90 cellules souches par embryon et dans une fenêtre développementale très réduite (Okutsu et al., 2006b).

Préparation des cellules germinales souches

Notre équipe maîtrisait une méthode originale de purification de cellules germinales souches, basée sur le principe de l'élu-triation centrifuge⁴ de la suspension cellulaire testiculaire totale (Rolland et al., 2009 ; Bellaiche et al., 2014) (Figure 2). Cette maîtrise nous a permis de réaliser toutes les mises au point de la congélation sur une population cellulaire enrichie en nos cellules d'intérêt, et donc de cibler les analyses de viabilité sur ces cellules spécifiquement. Cela nous a affranchis du recours à l'utilisation d'animaux transgéniques possédant des cellules germinales souches fluorescentes, utilisés jusqu'alors pour évaluer les survies des cellules germinales souches à la décongélation (Okutsu et al., 2007 ; Lee et al., 2013). Cette étape d'élu-triation centrifuge nécessite un matériel peu répandu et un personnel formé, qui ne seront pas forcément disponibles lors de congélations de routine en cryobanque. C'est pourquoi dans un second temps, nous avons vérifié que les suspensions de cellules testiculaires totales pouvaient être utilisées de la même façon et avec les mêmes taux de succès reproducteur que les cellules purifiées.

Mise au point de la cryoconservation



Figure 2 : Purification des cellules germinales souches
Les testicules de plusieurs mâles sont mélangés et dilacérés, avant une dissociation enzymatique puis mécanique des cellules. Les cellules sont ensuite séparées, selon leur taille et leur densité, par une centrifugation associée à un contre-courant de milieu de culture. La fraction enrichie en cellules germinales souches est retenue pour les tests de congélation.

⁴ Il s'agit d'une centrifugation associée à un contre-courant de milieu. La force centrifuge qui s'exerce sur les cellules est contre-carrée par la force centripète du courant de milieu se dirigeant vers le centre du rotor. Un faible débit de contre-courant induit la sortie vers le centre des cellules les plus petites ; l'augmentation progressive du débit permet ensuite la sortie des cellules les plus grosses, telles que les cellules germinales souches.

Critères de qualité

Les paramètres permettant d'évaluer la qualité des cellules décongelées doivent être soigneusement choisis au regard des cellules considérées. Dans le cas des cellules germinales souches, moins abondantes que les spermatozoïdes (quelques milliers contre plusieurs milliards par individu) et dont la prolifération en culture n'est pas encore maîtrisée, un paramètre important est le taux de récupération des cellules. Il permet d'évaluer combien de cellules ont éclaté (non retrouvées à la décongélation), ces disparues étant bien sûr absentes des analyses habituelles de viabilité. Un second critère choisi a été le maintien de la taille et de la structure des cellules. Enfin, le dernier paramètre que nous avons retenu est l'intégrité de la membrane plasmique, révélée par l'imperméabilité des cellules à un fluorochrome, l'iodure de propidium. Ces trois paramètres peuvent être analysés sur une petite fraction cellulaire et en une seule fois par cytométrie en flux (Figure 3), selon des critères faciles à paramétrer. Ils peuvent également être utilisés facilement sur une fraction du matériel en sortie de cryobanque, juste avant l'utilisation des cellules. L'évaluation du potentiel reproducteur est traitée plus loin.

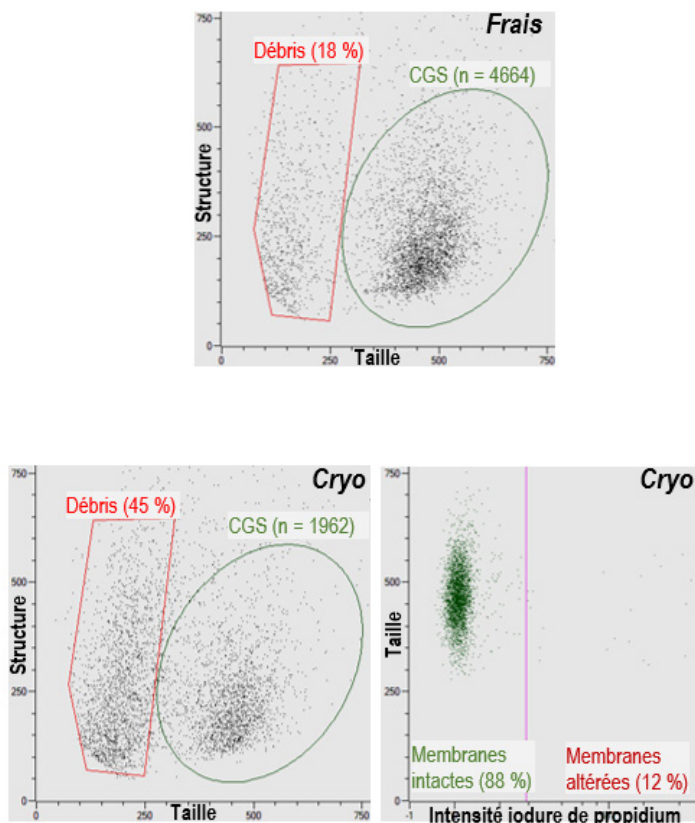


Figure 3 : Exemple de profil de cytométrie en flux de cellules germinales souches (CGS) fraîches (Frais, en haut) et cryoconservées (Cryo, en bas).

Après congélation, la fenêtre des CGS ne contient plus que 42 % des cellules initiales (1962/4664), et la proportion de débris a augmenté. Si l'on ne regarde que la qualité des CGS obtenues (à droite), on conclura que 88 % des cellules décongelées sont viables (membranes intactes). Mais, le véritable rendement de cette congélation est de 37 % (42 % de cellules, viables à 88 %).

Choix des conditions de congélation

Il est souvent difficile de reproduire les résultats de congélation de travaux publiés, car les équipements de congélation peuvent différer, le matériel biologique peut être de qualité différente et la variabilité (aléas) des procédures est rarement traitée dans les publications. Nous avons choisi de tester dans nos conditions : le protocole publié par Lee et al. (2013), deux méthodes que nous maîtrisons, l'une pour la congélation de cellules embryonnaires isolées (Leveroni-Calvi et al., 1998) et l'autre pour les cellules somatiques (Mauger et al., 2006) chez la truite arc-en-ciel, et une méthode mise au point pour les PGCs (Riesco et al., 2012). À ces procédures de référence, nous avons ajouté le testage d'une congélation en paillettes 500 μ L (en remplacement des cryotubes habituellement utilisés), et le remplacement des additifs d'origine animale par un milieu synthétique à base d'acide hyaluronique, le Cryo3 (Stem Alpha, France). Les différents paramètres testés sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Liste des différents paramètres testés pour la cryoconservation des cellules germinales souches. La combinaison retenue est signalée par*. L'ensemble de la procédure mise au point, incluant la composition du milieu et la vitesse de congélation, est disponible auprès des auteurs (C. Labbé) ou par le portail des collections de CRB Anim <https://crb-anim.fr/access-to-collection/#/>.

CRYOPROTECTEURS	ADDITIFS	CONTENANTS	MODES DE CONGÉLATION
DMSO	BSA	Cryotubes	Radeau
Propane 1,2-diol*	Jaune d'œuf	Paillettes 500 μ L*	Azote liquide (vitrification)
	Cryo3* (Stem Alpha)	Paillettes 250 μ L	Congélateur -80 °C (freeze box)
	PVP 40 000*		Congélateur programmable*
	FBS		

Résultats

La méthode optimale de cryoconservation a été très complexe à définir en raison des critères de qualité que nous nous étions fixés, incluant i) un rendement élevé de récupération des cellules germinales souches, ii) une qualité maximale des cellules survivantes, iii) une quantité de débris réduite (pour limiter la compétition entre débris et cellules dans la cavité du receveur greffé), iv) une capacité des cellules à survivre pendant 1 à 2 jours post-décongélation (pour mimer un temps théorique d'incorporation tissulaire post greffe). Le meilleur compromis a été trouvé avec une procédure de congélation très lente en congéla-

teur programmable, en paillettes 500 µL, sans induction de nucléation, et avec une solution cryoprotectrice à base de propane 1,2-diol et de Cryo3 (Tableau 1). Nos meilleurs rendements de récupération ont atteint 83 % des cellules fraîches, mais certaines expériences avec un matériel plus fragile, moins bien conservé lors de sa préparation, ont induit des rendements de 10 à 40 % seulement. Ces aléas de rendements seront à prendre en compte lors de la constitution de collections en cryobanque, car la qualité initiale de la préparation cellulaire vis-à-vis de son aptitude à la cryoconservation est difficile à évaluer (aucun critère fiable identifié). En revanche, la qualité des cellules décongelées est toujours proche (70 %) ou identique (100 %) au frais, et s'accompagne d'un taux très réduit de débris cellulaires. Cela signifie que, malgré des pertes d'amplitude variable, le matériel présent à la décongélation (après lavages) est de bonne qualité. Pour autant, même la meilleure méthode n'a pu empêcher une perte de 1/2 et 2/3 des cellules 24 h et 48 h post-décongélation respectivement, quels que soient nos efforts d'amélioration. Nous avons cependant observé, par la suite, que ces faibles survies ne sont pas un obstacle au succès de la greffe (voir ci-dessous).

Stratégie de régénération de la ressource génétique

Choix du receveur idéal

Au regard de la lourdeur technologique de la greffe (équipement de micromanipulation, formation de personnels à la microinjection, anticipation de la production des alevins receveurs et élevage jusqu'à leur maturité sexuelle), nous pensons que la restauration d'une lignée doit, autant que possible, utiliser la greffe pour assurer la production d'ovules seulement, la voie mâle étant apportée par du sperme cryoconservé de la même lignée. Ainsi, la greffe dans des alevins femelles permet de réduire de moitié le nombre d'individus greffés, et donc également la taille du cheptel à élever jusqu'à maturité. Cela permet, de plus, de réduire de moitié le matériel biologique (gonades immatures) nécessaire au moment de la congélation. Il apparaît donc judicieux d'utiliser des alevins receveurs issus de populations appelées monosexue femelle. Ces populations sont couramment produites en pisciculture, et donc aisément disponibles, grâce à une technologie d'inversion sexuelle permettant de produire des mâles XX dont la descendance sera uniquement femelle.

Un autre requis pour faciliter la restauration d'une lignée est que 100 % des ovules produits par la femelle soient issus des cellules germinales souches greffées, ce qui évite de trier les descendants après fécondation (par tests

génétiques ou phénotypiques). Il est donc nécessaire de disposer d'alevins receveurs stériles (ne produisant pas de gamètes), mais qui ont gardé la capacité à développer des ovaires fonctionnels. Ces populations stériles sont, elles aussi, disponibles en routine en pisciculture : un processus de triploïdisation des embryons juste après la fécondation est mis en œuvre par application d'un choc de pression hyperbare aux œufs fécondés (Chourrou, 1984), ce qui inhibe l'expulsion du second globule polaire de l'ovule. Les ovaires de ces femelles triploïdes se développent normalement, mais ils ont un aspect vide, car leurs ovocytes dégénèrent en début de méiose, avant l'initiation de la vitellogénèse (Lincoln et Scott, 1984). Les ovaires des animaux triploïdes gardent cependant leur capacité à produire des ovules fonctionnels après greffe de cellules germinales souches diploïdes (Okutsu et al., 2007).

Succès reproducteur des cellules germinales souches testiculaires cryoconservées

Après décongélation, la microinjection des cellules germinales souches est délicate, car ces cellules sont souvent contaminées par un gel d'ADN libéré des cellules altérées, provoquant l'occlusion du microcapillaire. L'ajout de DNase et la réduction de la concentration des cellules injectées font partie des ajustements nécessaires. Au final, les résultats de greffe sont excellents, puisque 89 % des femelles greffées avec des cellules germinales souches purifiées, cryoconservées dans la condition retenue, présentent des ovocytes diploïdes capables d'initier leur vitellogénèse (Figure 4), contre 78 % chez les femelles greffées avec des cellules fraîches. L'importance des colonisations est variable d'une femelle à l'autre, que ce soit chez les lots cryoconservés (Figure 4) ou chez les lots frais, mais il a été montré par ailleurs, dans l'équipe, que cela avait très peu d'incidence sur la quantité et la qualité des ovules produits in fine (Lareyre et al., communication personnelle).

Évolutions stratégiques : la cryoconservation de fragments testiculaires

Le choix de mettre au point la cryoconservation de cellules germinales souches testiculaires, que ce soit sous leur forme purifiée (enrichies par élutriation) ou sous forme d'une suspension de tous les types cellulaires testiculaires, présentait l'avantage d'une certaine sécurité. En effet, leur manipulation était maîtrisée dans l'équipe, et un savoir-faire important est disponible quant à la cryoconservation de cellules isolées (PGCs, cellules embryonnaires isolées, spermatozoïdes, cellules somatiques cultivées...). L'intérêt réside également dans une phase de restauration

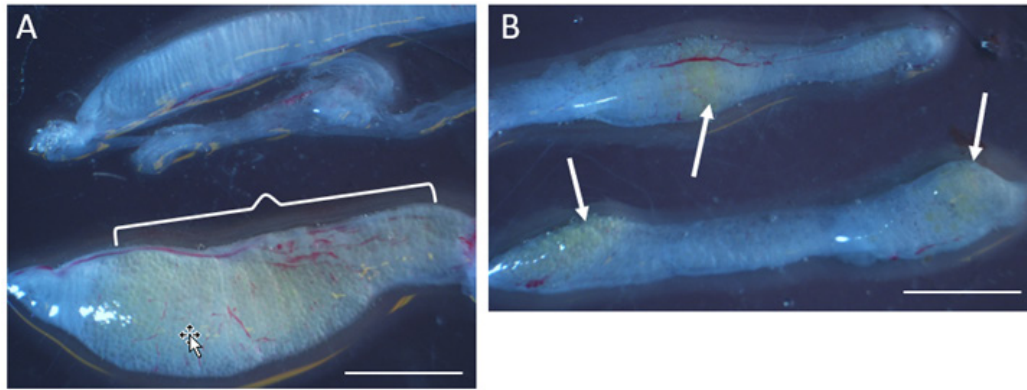


Figure 4. Exemple d'ovaires de truites stériles de 1 an, greffées au stade alevin avec des cellules germinales souches testiculaires cryoconservées. A : l'ovaire droit (au-dessus) présente des lamelles ovigères (stries) d'aspect vide, car aucun ovocyte en vitellogénèse n'est présent, tandis que l'ovaire gauche (au-dessous) est largement colonisé par des ovocytes vitellogénétiques (d'aspect orangé) (accolade blanche). B : Autre exemple où les deux ovaires comportent quelques îlots d'ovocytes vitellogénétiques (flèches). Barre d'échelle : 5 mm.

relativement simplifiée avec ce matériel, puisqu'il suffit de décongeler les cellules, de les laver et de les injecter dans les alevins receveurs. A contrario, la phase de préparation du matériel avant congélation imposée par cette stratégie peut constituer un frein à l'entrée en cryobanque d'une quantité importante de matériel. Il nous a donc semblé judicieux, dans un second temps, de développer une méthode de cryoconservation de fragments testiculaires, afin que l'étape de digestion des tissus et de dissociation des cellules soit reportée au moment de la décongélation, lorsque le besoin de restauration de la lignée est avéré.

Une difficulté importante, avec les fragments testiculaires, a été d'évaluer les rendements de récupération de cellules qui permettaient de discriminer les conditions, du fait de la grande hétérogénéité des contenus cellulaires entre fragments, y compris au sein d'un même individu. Nous avons cependant pu établir une méthode répétable de cryoconservation lente de fragments testiculaires, basée sur la méthode en cellules isolées en congélateur program-

mable (Figure 5, Planer), avec du Cryo3, et en cryotubes. Nous avons aussi éliminé le recours à la congélation de testicules entiers ou la congélation en boîte de congélation à -80 °C (Figure 5, CCBox), pour cause de rendements trop faibles ou trop aléatoires en termes de probabilité de succès. Les meilleurs rendements cellulaires obtenus sont bas, 1-4 % de cellules totales récupérées par rapport au frais. Ces taux restent cependant acceptables pour l'entrée de matériel en cryobanque. Ils impliquent de cryoconserver les testicules d'environ 90 poissons (âgés de 9 mois) pour obtenir un nombre de cellules décongelées suffisant pour greffer 200 alevins (donnant des centaines de descendants chacun).

Nous avons finalement testé une dernière stratégie de congélation, la vitrification. L'avantage de la vitrification est qu'elle suppose de plonger directement les tissus dans l'azote liquide (stérile), ce qui nous affranchit du congélateur programmable nécessaire pour la congélation lente. La congélation par vitrification consiste à limiter au maximum

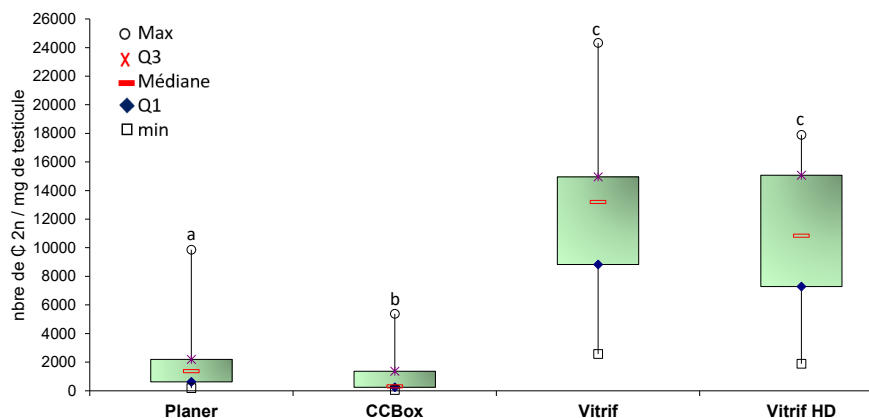


Figure 5. Performances des différentes méthodes de fragments testiculaires mises au point. Congélation lente en congélateur programmable (Planer) et en boîte de congélation à -80 °C (CCbox) ; Congélation par vitrification en brochettes (Vitrif) et par vitrification en système à haut débit (Vitrif HD).

la formation de cristaux de glace, en procédant à une descente en température extrêmement rapide, et en utilisant des cryoprotecteurs perméants à très forte concentration, pour inhiber la croissance des cristaux. Un écueil de la vitrification est que l'usage de concentrations élevées de cryoprotecteurs peut être toxique pour les cellules, et qu'il est très difficile d'assurer une congélation/décongélation assez rapides pour empêcher la formation de glace. Afin d'assurer les meilleurs échanges thermiques entre les fragments testiculaires et l'azote liquide ou le milieu de décongélation, nous avons d'abord testé la vitrification en « brochettes » (Wang et al., 2008 ; Liu et al., 2012 ; Marinovic et al., 2018) où des fragments d'une vingtaine de milligramme sont enfilés séparément sur une aiguille d'acupuncture, avant im-



Figure 6. Fragments testiculaires sur les aiguilles d'acupuncture dans le bain de cryoprotecteur.

mersion dans différents bains de cryoprotecteurs puis dans l'azote liquide (Figure 6).

Cette procédure de vitrification en brochettes nous a permis, contre toute attente au vu des aléas de la vitrification, d'augmenter jusqu'à 10 fois les taux de récupération de cellules totales (Figure 5, Vitrif). Nous avons ensuite adapté ce protocole, afin d'alléger la procédure de mise en brochettes très longue à mettre en œuvre et source de risque de dégradations et donc de variabilité (manipulation hors du milieu, hors du froid). La procédure finale retenue, basée sur un

système de plongeur refroidi et de manipulation de plusieurs dizaines de fragments en paniers, est plus adaptée à l'entrée en cryobanque de grande quantité de matériel, et elle nous a donné les mêmes rendements de récupération que la procédure en brochettes (Figure 5, Vitrif HD),

Application à la conservation en conditions de terrain

La cryoconservation de fragments testiculaires, et la décongélation et greffe des cellules ont été testées en condition de terrain, à la pisciculture expérimentale INRAE PEI-MA. Un personnel formé et habilité pour le sacrifice et la dissection des poissons a réalisé la collecte des testicules. D'après les taux de récupération attendus à la décongélation, nous avons estimé à 10 le nombre de mâles de 9 mois nécessaires pour greffer 180 alevins (obtention de 1,2 g de testicules immatures, collecte réalisée en 30 min). La vitrification à haut débit a été réalisée sur le site, dans un bain d'azote liquide, suivie d'un stockage en cryotubes sous azote liquide. Le lendemain, les fragments ont été décongelés par immersion dans des bains successifs de milieu de décongélation, et ils ont été dissociés enzymatiquement et mécaniquement par un personnel de laboratoire, avec un taux de récupération de 8 500 cellules/mg de testicule (17 % du frais). La greffe dans des alevins receveurs a été réalisée le jour même par une personne de la pisciculture qui avait été préalablement formée à la micromanipulation par notre équipe. Cette personne, avec l'aide d'un préposé à la préparation des alevins et des cellules, a greffé les 180 alevins en moins de 60 min. Les survies des alevins ont été conformes aux résultats habituels de greffe : 42 % de survivants à 4 mois, puis rares mortalités jusqu'à 12 mois. Pour cette expérience de terrain, nous avons greffé des alevins mâles et femelles. Après 1 an, les receveurs triploïdes greffés présentaient des ovocytes vitellogéniques (receveurs femelle) ou des cellules spermatogoniales diploïdes (receveurs mâles), et la proportion de receveurs positifs a été équivalente entre greffés avec des cellules cryoconservées et avec des cellules fraîches (Figure 7). Cela confirme donc les excellents résultats que nous avons déjà obtenus après cryoconservation de suspensions de cellules testiculaires enrichies en cellules germinales souches.

Le potentiel reproducteur des cellules cryoconservées a été testé un an après la greffe, du fait de difficultés à maintenir tous les lots expérimentaux en élevage pendant les 2 et 3 années nécessaires à l'obtention de spermatozoïdes et ovules matures. Pour confirmation, des lots issus de cryoconservation sont cependant toujours en élevage à

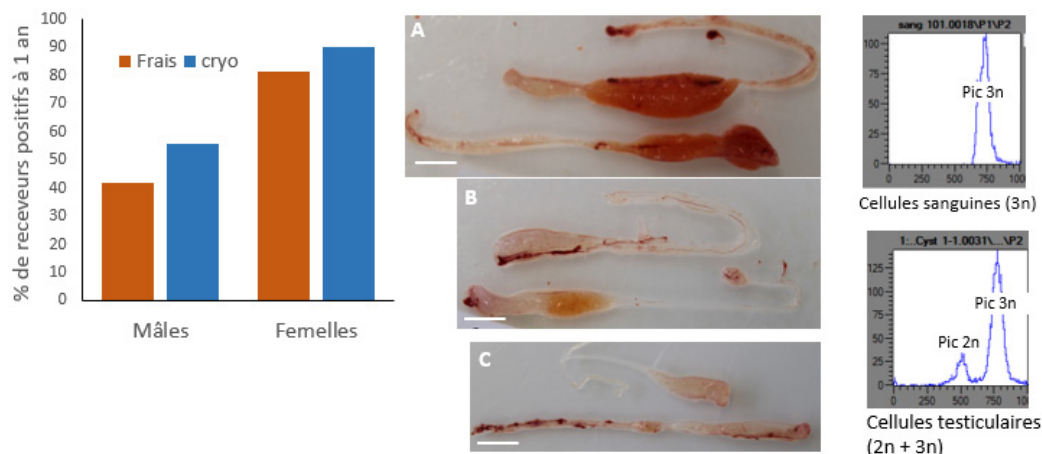


Figure 7. Succès de développement de gamètes après greffe de cellules testiculaires totales issues de testicules frais (Frais) ou vitrifiés (cryo), en conditions de pisciculture (graphe de gauche).

Les animaux âgés de 1 an ont été phénotypés comme suit : chez les femelles, le développement d'ovocytes vitellogéniques permet de discriminer visuellement les gonades colonisées (photos A et B) des gonades négatives (photo C) (barre d'échelle 5 mm) ; chez les mâles, la présence de cellules spermatogoniales diploïdes doit être recherchée par cytométrie en flux (cytogrammes à droite). La nature triploïde du receveur est attestée par le pic unique de cellules sanguines en position 3n (haut). La présence de cellules diploïdes (2n) parmi les cellules testiculaires (bas) atteste de la colonisation des gonades et de la prolifération des cellules germinales souches greffées.

INRAE PEIMA (croissance et survies normales), et notre expérience en frais nous laisse augurer des taux de succès similaires entre les observations à 1 an et les observations à maturité. De plus, malgré le succès de la vitrification à haut débit et son applicabilité, quelques ajustements techniques peuvent encore être apportés. Par exemple, les fragments testiculaires vitrifiés, qui se manipulent comme des perles, ont été regroupés dans des cryotubes. Leur incorporation dans des paillettes 1 ml (IMV Technologies) est prévue, pour un stockage dans les mêmes containers que les paillettes de semence.

Conclusion

L'ensemble de ce travail a conduit à définir deux procédures de cryoconservation de cellules germinales souches, l'une sur cellules testiculaires isolées, l'autre sur fragments testiculaires ; toutes deux permettent un succès de colonisation des gonades des receveurs équivalent aux contrôles frais (Tableau 2). À ce stade, ces méthodes peuvent déjà être utilisées pour l'entrée en cryobanque de ce matériel indispen-

sable à la conservation complète de différents génotypes chez les poissons. Pour autant, les étapes de dissection de gonades, de dissociation cellulaire et de greffe des alevins restent exigeantes techniquement. Une réflexion est en cours sur l'organisation à mettre en place pour intégrer cette technologie à l'offre des centres de congélation aquacoles, et pour la rendre disponible sur certains sites piscicoles.

La greffe permet la production de gamètes fonctionnels et alimente certaines questions scientifiques de l'équipe. Par exemple, la façon dont les cellules germinales souches intègrent la gonade larvaire n'est pas connue. On ignore si les cellules sont incorporées avec leur propre niche (cellules de Sertoli), si elles s'intègrent dans des régions fragilisées de la gonade receveuse, et si elles s'intègrent en paquet dans un îlot donné ou individuellement. Ces interrogations ont pour corollaire la diversité génétique des gamètes régénérés, car on ignore encore s'ils sont issus de tous les mâles représentés dans le pool testiculaire ou de seulement quelques-uns (des travaux utilisant des mélanges de cellules germinales souches issues de donneurs de lignées isogéniques diff-

Tableau 2 : Caractéristiques des méthodes de cryoconservation des cellules germinales souches testiculaires (CGS)

Animal donneur / Receveur	Mâles adultes sexuellement immatures / Alevins femelles triploïdes stériles		
Matériel biologique utilisé pour la cryoconservation	CGS enrichies par élutriation	Fragments testiculaires	Fragments testiculaires
Mode de congélation	Lent, en paillettes 500 µL	Lent, en cryotubes	Rapide, vitrification à haut débit
Rendements de récupération de cellules à la décongélation	10-83 %	1-4 %	10-40 %
Potentiel reproducteur / frais (% de gonades colonisées à 1 an)	100 %	Non testé	100 %
Nombre de donneurs de 9 mois nécessaires pour 180-200 receveurs	10	90	10

rentes sont en cours). Un autre axe de recherche concerne la pérennité des collections lorsque le matériel est décongelé. Il serait particulièrement précieux de pouvoir dériver une partie des cellules décongelées pour les mettre en culture, les faire proliférer et les recongeler. Cela éviterait de devoir attendre le développement des descendants pour régénérer la collection. Des stratégies originales de culture en organoïdes sont à l'étude dans l'équipe. De même, l'intégrité épigénétique des gamètes produits par greffe est un élément de recherche en cours, notamment au niveau de la méthylation de l'ADN, du fait de l'importance de cette marque pour l'embryon (Labbé et al., 2017).

La diffusion de cette stratégie de conservation à d'autres espèces est bien sûr envisagée, d'autant plus que le nombre d'espèces aquacoles domestiquées augmente. On peut considérer que la cryoconservation des fragments testiculaires devrait être adaptable, du fait des similitudes tissulaires des testicules de différentes espèces. En revanche, nous avons déjà l'expérience d'espèces dont les alevins sont très petits, ou très fragiles vis-à-vis de l'injection, ce qui rend ces espèces difficiles à régénérer par greffe. Des études sont initiées dans l'équipe, et dans la communauté internationale (revu par Yoshizaki et Yasawa, 2019), pour développer la greffe interspécifique : les cellules germinales souches de l'espèce d'intérêt sont greffées à des alevins d'une espèce proche dont l'élevage est aisé et maîtri-

sé. Les applications en aquaculture sont majeures pour la conservation, mais aussi pour raccourcir l'intervalle entre générations d'espèces à puberté tardive, ou pour produire des individus génétiquement stériles ou issus d'espèces dont la maturation sexuelle finale n'est pas maîtrisée (Yoshizaki et Yasawa, 2019).

Il convient de préciser, cependant, que le recours à la cryoconservation de cellules germinales souches adultes peut être empêché en l'absence d'animaux donneurs à des stades adaptés, ou face à des individus particuliers dont le sacrifice n'est pas envisageable. Une stratégie complémentaire à l'étude est la cryoconservation de cellules de peau (nageoires), car les fragments de nageoires sont disponibles et collectables à haut débit, sans sacrifier l'animal et quels que soient son âge et son sexe. Ces cellules somatiques impliquent, toutefois, de maîtriser la régénération par transfert nucléaire (Martinez-Paramo et al., 2017), et notamment de surmonter les difficultés liées à l'obtention de descendants intègres épigénétiquement (Depincé et al., 2021) et génétiquement (perte de l'ADN mitochondrial). L'ensemble de ces études, incluant les promesses des unes et les progrès des autres, permettent d'envisager, à terme, la mise à disposition d'un choix de technologies de la conservation adaptées aux contraintes des espèces et au contexte environnemental et sociétal dans lequel elles seront mises en œuvre. ■

Remerciements

Ce travail a été financé par le PIA CRB Anim ANR-11-INBS-0003, par les projets européens AQUAEXCEL2020 et AQUAEXCEL3.0, et par le projet FEAMP BIOGERM mesure 47 (Innovation Aquaculture). Les auteurs remercient les personnels des installations expérimentales de INRAE LPGP et de la pisciculture INRAE PEIMA pour le soin apporté à la production des donneurs, des receveurs et à l'élevage des précieux animaux greffés.

Références

Bellaïche J., Lareyre J.J., Cauty C., Yano A., Allemand I. and Le Gac, F., 2014. Spermatogonial Stem Cell Quest: nanos2, Marker of a Subpopulation of Undifferentiated A Spermatogonia in Trout Testis. *Biology of Reproduction* 90. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116392>.

Chourrout D., 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture* 36, 111-126. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90058-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90058-9).

Depincé A., Le Bail P.-Y., Rouillon C. and Labbé, C., 2021. Embryonic fate after somatic cell nuclear transfer in non-enucleated goldfish oocytes is determined by first cleavages and DNA methylation patterns. *Sci Rep* 11, 3945. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83033-2>.

Labbé C., 2013. Spécificités de la cryoconservation des ressources génétiques chez les espèces aquacoles. *STAL Sciences et Techniques de l'Animal de Laboratoire* 39, 67.

Labbé C., Robles V. and Herraéz M.P., 2017. Epigenetics in fish gametes and early embryo. *Aquaculture* 472, 93-106. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.026>.

Labbé C., Robles V. and Herraéz M.P., 2013. Cryopreservation of gametes for aquaculture and alternative cell sources for genome preservation, in: Allan, G., Burnell, G. (Eds.), *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Lacerda S.M.S.N., Costa G.M.J., Campos P.H.A., Segatelli T.M., Yazawa R., Takeuchi Y., Morita T., Yoshizaki G. and Franca L.R., 2013. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiol Biochem* 39, 3–11. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9606-4>.

Lee S., Iwasaki Y., Shikina S. and Yoshizaki G., 2013. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 1640–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218468110>?

Lee S., Katayama N. and Yoshizaki G., 2016. Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells. *Biochem Biophys Res Commun* 478, 1478–1483. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.156>.

Leveroni-Calvi S. and Maisse G., 1998. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres: Influence of embryo stage on postthaw survival rate. *Cryobiology* 36, 255–262.

Lincoln R.F. and Scott A.P., 1984. Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* 25, 385–392. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04886.x>.

Liu J., Cheng K.M. and Silversides F.G., 2012. Novel needle-in-straw vitrification can effectively preserve the follicle morphology, viability, and vascularization of ovarian tissue in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Animal Reproduction Science* 134, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.002>.

Marinovic Z., Lujic J., Kasa E., Csenki Z., Urbanyi B. and Horvath A., 2018. Cryopreservation of Zebrafish Spermatogonia by Whole Testes Needle Immersed Ultra-Rapid Cooling. *Jove-Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/56118>.

Martínez-Páramo S., Horváth Á., Labbé C., Zhang T., Robles V., Herráez P., Suquet M., Adams S., Viveiros A., Tiersch T.R. and Cabrita E., 2017. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture, Recent advances in fish gametes and embryo research* 472, 156–177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>.

Mauger P.E., Le Bail P.Y. and Labbe C., 2006. Cryobanking of fish somatic cells: optimizations of fin explant culture and fin cell cryopreservation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 144, 29–37.

Okutsu T., Shikina S., Kanno M., Takeuchi Y. and Yoshizaki G., 2007. Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science* 317, 1517.

Okutsu T., Suzuki K., Takeuchi Y., Takeuchi T. and Yoshizaki G., 2006a. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2725–2729.

Okutsu T., Yano A., Nagasawa K., Shikina S., Kobayashi T., Takeuchi Y. and Yoshizaki G., 2006b. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *J Reprod Dev* 52, 685–693.

Riesco M.F., Martínez-Pastor F., Chereguini O. and Robles V., 2012. Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols. *Theriogenology* 77, 122–130.e2. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.024>.

Rolland A.D., Lareyre J.-J., Goupil A.-S., Montfort J., Ricordel M.-J., Esquerré D., Hugot K., Houlgatte R., Chalmel F. and Le Gac F., 2009. Expression profiling of rainbow trout testis development identifies evolutionary conserved genes involved in spermatogenesis. *BMC Genomics* 10, 546. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-546>.

Takeuchi Y., Yoshizaki G. and Takeuchi T., 2004. Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature* 430, 629–630. <https://doi.org/10.1038/430629a>.

Wang Y., Xiao Z., Li L., Fan W. and Li S.-W., 2008. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Human Reproduction* 23, 2256–2265. <https://doi.org/10.1093/humrep/den255>.

Yoshizaki G., Fujinuma K., Iwasaki Y., Okutsu T., Shikina S., Yazawa R. and Takeuchi Y., 2011. Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for the preservation of genetic resources. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 6, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.cbpd.2010.05.003>.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

FOCUS

Conserver les sols : pourquoi et comment ?

Nicolas SOLER-DOMINGUEZ¹

Céline RATIÉ²

Céline FAIVRE-PRIMOT³

Samuel MONDY⁴

CORRESPONDANCE

nicolas.soler-dominguez@inrae.fr

celine.ratie@inrae.fr

celine.favre-primot@inrae.fr

samuel.mondy@inrae.fr

Pour comprendre le fonctionnement et les cycles du sol, il faut pouvoir l'étudier, donc le conserver. Plusieurs Infrastructures participent à une meilleure connaissance et gestion des sols, grâce à une approche pluridisciplinaire : les Observatoires de Recherche de l'Environnement (<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02330284>), les zones Ateliers (<https://www.za-inee.org/>), les Infrastructures de Recherche comme AnaEE ou RARe, les plateformes d'expérimentation en milieux contrôlés ou *In Natura*, ou encore les groupements scientifiques.

En particulier à INRAE, deux structures ont été montées avec comme activité principale la conservation de sols : le Conservatoire Européen des Échantillons de Sols (<https://doi.org/10.15454/VCZ6BS> Orléans, Centre Val de Loire) et le Centre de Ressource Génétique de la plateforme GenoSol (<https://doi.org/10.15454/L7QN45> Dijon, Centre Bourgogne - Franche-Comté). Ces deux outils sont complémentaires et permettent de répondre aux enjeux pluridisciplinaires de l'institut et à ses objectifs, en particulier sur la composante sol, que ce soit dans le cadre de l'objectif 4pour1000 (<https://www.4p1000.org/fr>) ou dans la réponse des sols au dérèglement climatique. Focus sur ces deux Infrastructures Scientifiques Collectives d'INRAE (labellisées ISC).

1 Unité InfoSol US 1106 - Responsable technique du Conservatoire Européen des Échantillons de Sols.

2 Unité InfoSol US 1106 - Responsable de la plateforme CEES.

3 UMR Agroécologie 1347 - Responsable CRG de la plateforme GenoSol.

4 UMR Agroécologie 1347 - Responsable de la plateforme GenoSol.

Le sol, une interface vitale et complexe

Le sol est une couche meuble qui résulte de l'interaction entre la lithosphère (dégradation de la roche-mère), l'atmosphère, l'hydrosphère et la biosphère. Non renouvelable à l'échelle d'une génération humaine, il se définit habituellement par sa composition et ses propriétés.

C'est un véritable capital naturel, caractérisé par le stockage de matière minérale et organique, par la biodiversité qu'il héberge, mais aussi par les flux qu'il génère et qui permettent de fournir nombre de services répondant à des besoins humains. Ces services que l'on qualifie de services écosystémiques (Figure 1) sont regroupés en quatre grandes catégories i) services de support ii) services d'approvisionnement iii) services de régulation iv) et services culturels. Ils permettent de remplir de nombreux besoins : physiologique, santé, sécurité, nourriture et habitat.

Pour comprendre le fonctionnement et les cycles du sol, il faut pouvoir l'étudier ; et ce, à de multiples échelles, tant d'un point de vue spatial, en intégrant la composante en trois dimensions du sol, que temporel, en regardant l'évolution du sol en fonction des saisons et de l'hygrométrie, en particulier dans un contexte de dérèglement climatique. La conservation du sol provenant de dispositifs naturels ou d'expérimentation devient un challenge important pour i) La valorisation de dispositifs expérimentaux de long terme et ii) la mise en conservation d'échantillonnage de grande ampleur, tel le Réseau de Mesures de la Qualité des Sols (RMQS). Cette conservation a pour but la mise en mémoire

des sols et contribue à une meilleure compréhension de ses mécanismes. Il est important de noter que les conditions de stockage de ces échantillons sont dépendantes des questions scientifiques : les solutions techniques et de gestion des aliquots seront différentes et adaptées en fonction des questions.

Les enjeux de la conservation des sols

Les changements actuels liés au dérèglement climatique, l'anthropisation croissante des écosystèmes et la volonté d'engager la transition agroécologique nécessitent d'avoir à disposition du monde scientifique des témoins et des standards d'échantillons de sols qui pourront être comparés aux échantillons qui seront prélevés dans le futur. De plus, les importants investissements financiers et humains, dans le cas de dispositifs expérimentaux ou de suivi à long terme, exigent de pouvoir valoriser le travail accompli. Il est ainsi primordial de pouvoir conserver des quantités suffisantes d'échantillons de sols, mais aussi de garantir la stabilité de leurs caractéristiques et propriétés, sur le long terme, pour pouvoir les **remobiliser** ; en effet, les avancées technologiques font qu'il sera possible d'analyser ultérieurement ces échantillons avec des méthodes de rupture. Ce principe de prévoir la réalisation des analyses a posteriori avec des techniques non disponibles au moment du prélèvement est un point crucial de la conservation. En effet, il permettra, en fonction des évolutions observées d'indicateurs, de vérifier le niveau en amont et d'appréhender les dynamiques

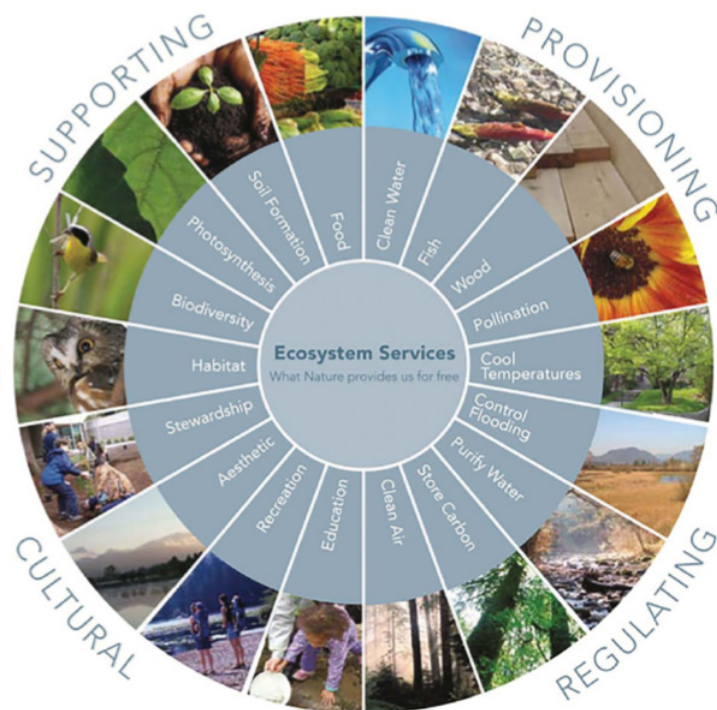


Figure 1. Les services écosystémiques selon le Millenium Ecosystem Assessment (source Metro Vancouver)

spatiales et temporelles sous-jacentes. Ces analyses a posteriori pourraient répondre à des **problématiques émergentes** ou à de nouvelles questions non présentes au moment de l'échantillonnage.

Les techniques d'analyses, les seuils de détection de différents éléments s'affinent au fur et à mesure des années, la remobilisation d'échantillons conservés permet la mise en évidence de **nouvelles informations** non accessibles avant. De plus, des conditions stables de conservation, associées à un suivi métrologique, doivent permettre de vérifier la stabilité ou non des échantillons conservés, en particulier **l'évaluation d'éventuelles dérives analytiques** dans le temps. L'utilisation d'échantillons standards doit permettre de distinguer ce qui ressort des facteurs de forçage plus que d'évolutions des caractéristiques des sols au cours du stockage. Par exemple, la quantité de Carbone organique en fonction des conditions de stockage (lyophilisation ou

non, conservation à température ambiante ou congélation) peut varier au cours du stockage. Il est impératif de pouvoir évaluer ces évolutions. Enfin, la conservation des échantillons permet de découpler prélèvement et analyses, ce qui permet de rendre possible des analyses pour lesquelles aucun budget n'était disponible au moment du prélèvement.

Les mesures et analyses des caractéristiques du sol peuvent être de plusieurs natures (Figure 2). Ainsi, le CEES (Conservatoire Européen des Échantillons de Sols) et le CRB (Centre de Ressources Biologiques) de la plateforme GenoSol, bien que travaillant sur la même matrice environnementale, le sol, ne mesurent pas les mêmes choses. Le CEES vise plus à permettre la caractérisation physico-chimique et donc une conservation permettant ce type d'analyse, tandis que la plateforme GenoSol s'intéresse aux mesures de l'activité biologique, en particulier de la diversité des micro-organismes (bactéries, archées et champignons).

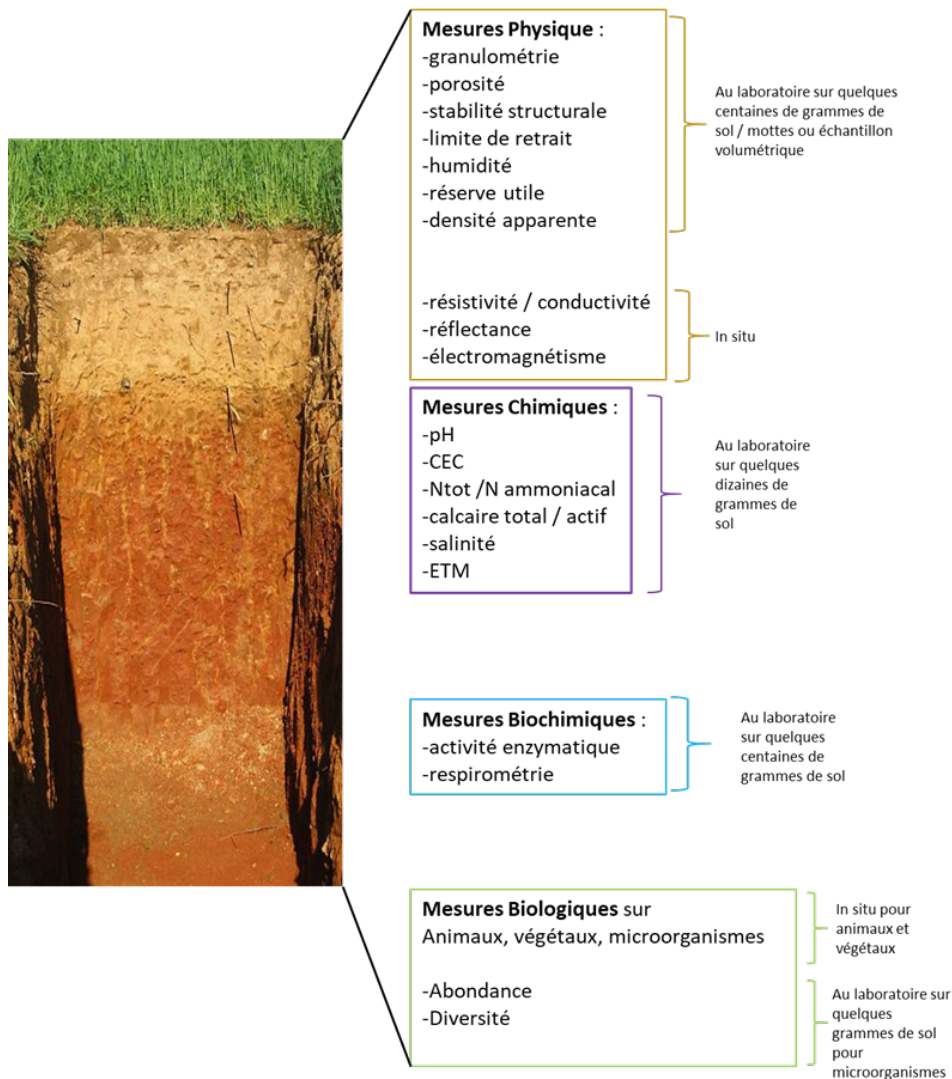


Figure 2. Diversité des paramètres mesurables pour un échantillon de sol. Les mesures peuvent être physiques, chimiques, biologiques ou biochimiques.

Les différentes analyses nécessitent des masses différentes et des modes de préparation différents, qui ont un impact sur les processus de préparation des échantillons (Tableau 1). Le dimensionnement des structures de conservation et les flux analytiques sont donc variés, et dépendent du type d'analyses ainsi que des questionnements scientifiques ou sociétaux auxquels ces analyses doivent répondre.

Tableau 1: Relation entre analyses, prise d'essai et mode de préparation, et horizons étudiés

Analyses	Prise essai	Préparation échantillon	Commentaire
Activité enzymatiques	Quelques dizaines de grammes	Frais Tamisé 5mm	Sur horizon de surface
Microbiologie : approche cultivable	Quelques grammes	Sec ou frais tamisé	Sur horizon de surface
Microbiologie : approche moléculaire	1g	Lyophilisé et tamisé 4mm	Sur horizon de surface
Physico-chimie	De 1 à quelques centaines de grammes	Brut, broyé à 2mm, broyé < 250µm	Sur différents horizons
Mésofaune	Cylindre 5cm diamètre	Sol brut	Sur horizon de surface (Profondeur 4cm)
Lombric	In situ sur 3*1m ²	Extraction formol/moutarde ou test bêche	
Macrofaune totale	Bloc sol 25*25*15 cm	Sol brut	Sur différents horizons
Stock semencier	300g	Sol brut non remanié	Sur horizon de surface

Le Conservatoire Européen des Échantillons de Sols (CEES) : un bâtiment en terre pour stocker des échantillons de sols...

Le Conservatoire des Sols est géré par l'unité InfoSol d'INRAE. Géographiquement implanté sur le Centre d'Orléans (<https://www.gissol.fr/le-gis/conservatoire-des-sols-992>), il est rattaché au Département AgroEcoSystem. L'unité InfoSol dépend directement du Groupement d'Intérêt Scientifique «Sol» Gis Sol (<https://www.gissol.fr/>). Ce GIS a été créé, en 2001, à l'initiative de plusieurs partenaires (le ministère de la transition écologique, le ministère de l'agriculture et de l'alimentation, l'ADEME, l'IGN, l'IRD, l'OFB, le BRGM et INRAE) ; il a pour but de constituer et de gérer le système d'information sur les sols de France, en vue de répondre aux demandes des pouvoirs publics et de la société, aux niveaux local et national.

Le Gis Sol conçoit, oriente et coordonne l'inventaire géographique des sols, le suivi de leurs propriétés et l'évolution



de leur qualité, en même temps qu'il gère le système d'information sur les sols (Donesol). Il assure également la valorisation des données sur les sols de France, en cohérence avec les programmes européens.

Le CEES constitue un outil collectif d'INRAE dont l'objectif principal est **la conservation à long terme d'échantillons de sols**. Il a été mis en place, en 2003, pour les échantillons de sols prélevés dans le cadre du Réseau de Mesures de la Qualité des Sols (RMQS). Ses activités se sont par la suite étendues, d'une part, aux échantillons issus des programmes nationaux d'inventaires de sols et, d'autre part, à des échantillons issus de programmes scientifiques de surveillance des sols, comme le projet européen Integrated Carbon Observation System (ICOS).

L'équipe du Conservatoire est composée de cinq personnes. Le CEES est un local de stockage d'environ 370 m² qui contient environ 70 000 échantillons, soit 98 tonnes, conservés en conditions contrôlées, adossé à un laboratoire comprenant une salle de réception/préparation des échantillons, salle de séchage, salle des étuves et une salle de lavage. Il utilise la base de données de l'Unité, Donesol, pour l'enregistrement des échantillons et toute la traçabilité de leur traitement, depuis leur arrivée au Conservatoire jusqu'à leurs divisions successives par création d'aliquotes pour envoi aux laboratoires partenaires ou pour des mises à dispositions ultérieures (Figure 3).

Donesol permet d'enregistrer la description du profil faite sur le terrain, d'où sont prélevés les échantillons. Ces derniers, après vérification de leur validité par rapport au cahier des charges, sont rattachés aux horizons décrits ; l'historique de leurs actions est enregistré jusqu'à leur stockage définitif. En fin de chaîne, la BdD permet d'associer à ces données pédologiques les résultats des analyses faites dans différents laboratoires INRAE ou non-INRAE, en fonction des projets associés.

Le Conservatoire a pour vocation de garder le plus longtemps possible les échantillons à disposition pour des projets scientifiques, de nouvelles analyses ou encore des ré-analyses en fonction de problématiques. Dans ce cadre,

les objectifs de la conservation sont :

- Construire la mémoire de nos sols pour pouvoir remonter le temps.
- Prévoir les évolutions en termes d'analyses : fournir un même échantillon quelques années plus tard pour refaire des analyses dont le seuil de détection a été amélioré ou encore faire une analyse qui n'était pas possible ou trop coûteuse quelques années plus tôt.
- Mettre à disposition une banque d'échantillons et les métadonnées associées.



Figure. 3. Process de mise en conservation : de la réception à la conservation des sols

Le CEES étant une plateforme INRAE, on pourrait considérer qu'il a vocation à recevoir tous les échantillons de sols provenant de dispositifs expérimentaux ou d'observatoires environnementaux patrimoniaux. Or, de par la capacité de stockage limitée du conservatoire et la nature du processus de mise en conservation, l'intégration des échantillons est soumise à conditions :

- Le lot d'échantillons doit correspondre à une étude pédologique déjà présente (ou saisie à l'occasion) dans la Base de Données nationale Donesol.
- Le lieu de prélèvement de l'échantillon est repéré par des coordonnées géographiques (en BdD).
- L'échantillon doit être intègre (ne pas avoir subi de modification physique, séchage à température élevée, etc.)

- L'échantillon doit être en quantité suffisante entre 500 g et 1 kg en moyenne.

Les demandes de stockage comme les demandes de mise à disposition d'échantillons sont arbitrées par le Gis Sol qui gouverne l'Unité InfoSol et le CEES.

Le Centre de Ressources Génétiques de la plateforme GenoSol



La deuxième structure INRAE dont le cœur de métier est la conservation à long terme de matrices environnementales se situe dans l'UMR Agroécologie de Dijon ; elle a pour objectif le stockage et la caractérisation moléculaire d'échantillons de sols par des approches de communautés microbiennes.

La plateforme GenoSol a été créée, en 2008, au sein de l'UMR Agroécologie INRAE, centre Bourgogne-Franche-Comté de Dijon (https://www2.dijon.INRAE.fr/plateforme_genosol/). Cette plateforme offre une infrastructure unique en Europe, dont l'objectif est de fournir une structure logistique et technique assurant l'acquisition, la conservation, la caractérisation et la mise à disposition des ressources génétiques (ADN) des sols issus d'échantillonnages de grande envergure. Elle s'articule autour de trois structures principales :

- Un **Centre de Ressources Génétiques (CRG)** qui a pour but de stocker et de conserver les ressources génétiques (sols et ADN) et de les mettre à disposition de la communauté scientifique.
- Un Laboratoire d'Analyses et de Développement Moléculaires. Cette **plateforme technique** a pour but de développer la veille technologique sur les méthodes d'extraction des acides nucléiques des sols et les outils de caractérisation des ressources génétiques microbiennes. La plateforme a, dans un premier temps, travaillé sur des approches de type métabarcoding (amplification de gènes marqueurs). Elle évolue en ajoutant à son offre de services des extractions permettant des approches métatranscriptomiques et métatranscriptomiques.

- Un **Système d'Information Environnementale** (SIE) centré sur le développement de la base de données MicroSol-database (<http://prodinra.inra.fr/record/20022>) qui permet, d'une part, de gérer le conservatoire, les métadonnées associées aux sols et la traçabilité de ses échantillons (lieu de stockage, suivi des opérations sur les sols) et, d'autre part, de stocker les données issues des analyses du LADM.

La plateforme GenoSol, pour ses activités de conservatoire et de SIE, est articulée avec le CEES d'INRAE Orléans qui, via la base de données Donesol, stocke les résultats des analyses physico-chimiques des sols (Carbone, azote, pH, polluants...). Sur les 21 000 sols stockés au sein du CRG de la plateforme GenoSol, environ 4 000 sols sont communs avec ceux d'InfoSol. Ces deux conservatoires sont destinés à des communautés scientifiques et professionnelles différentes (science du sol, pour InfoSol, et biologie/écologie pour GenoSol). La plateforme s'est engagée dans une démarche d'amélioration continue, dès sa création, qui a été couronnée par une certification ISO9001, en 2015, pour le CRG, puis pour la totalité du périmètre de la plateforme en 2018.

proposée, lors des périodes habituelles d'échantillonnage (février à mai), et sur les dispositifs en démarrage, pour assurer la formation des personnels des sites au prélèvement et à la préparation. Les échantillons de sols conservés proviennent en majorité de réseaux de surveillance et d'observation des sols (nationaux et européens), de sites expérimentaux pérennes (INRAE, CNRS, IRD, Institut technique agricole...) et de réseaux d'exploitations agricoles. Tous ces sites sont impliqués dans des questionnements en lien avec l'évaluation environnementale des modes d'usages des sols, et trouvent dans la plateforme GenoSol une aide logistique pour renforcer les systèmes d'observation de la biodiversité tellurique. À ce jour, plus de 21 000 sols sont stockés dans le CRG, et 600 à 1 000 nouveaux sols arrivent annuellement. Les locaux de 150 m² abritent 20 congélateurs -40 °C d'une capacité de 1 440 échantillons chacun. Deux congélateurs de secours sont prévus pour permettre la mise en sécurité des échantillons en cas de pannes.

Après avoir échantillonné le dispositif, les sols sont homogénéisés puis tamisés à 4 ou 5 mm pour obtenir un échantillon de sol représentatif, dépourvu de la majorité

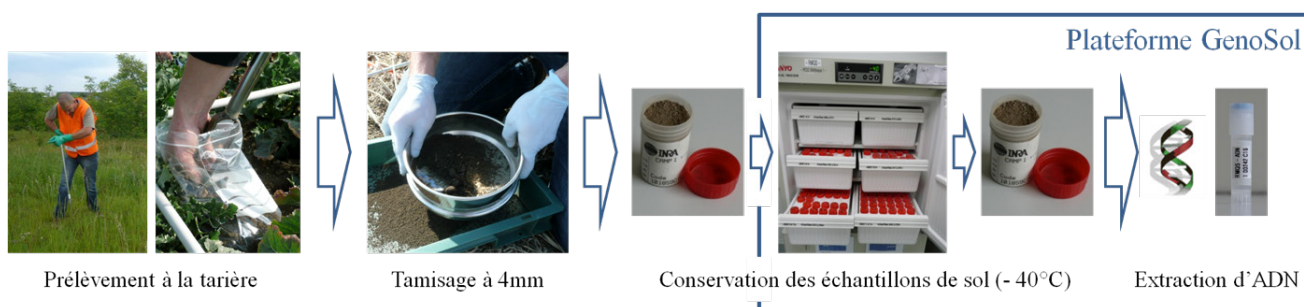


Figure 4. Process de mise en conservation des échantillons des sols au sein de la plateforme GenoSol

Le Centre de ressources génétiques de la plateforme GenoSol a pris le parti de conserver les informations génétiques des microorganismes (ADN) dans sa matrice originelle. Ainsi, le mode de conservation est axé sur la conservation du sol. L'ADN nécessaire à l'alimentation des outils moléculaires est extrait à partir d'une fraction de ce sol conservé (1 g). La conservation mise en place vise à garantir l'absence de modification biologique à l'intérieur de l'échantillon.

Le CRG se compose actuellement d'une Technicienne de Recherche à temps plein. Son activité principale est la gestion de la collection avec la réception et le tamisage des échantillons, leur mise en conservation, le suivi des installations et la fourniture des échantillons pour le laboratoire d'analyses moléculaires. Une activité de conseil sur la stratégie d'échantillonnage et l'aide au prélèvement est aussi

des éléments non concernés par les analyses ultérieures (cailloux, débris végétaux, restes animaux...). Ils sont ensuite réceptionnés au CRG et congelés à -30 °C. Cette étape de congélation permet de stopper la vie biologique de l'échantillon et prépare le sol à la lyophilisation (Figure 4). Les acides nucléiques dans les sols sont dégradés par des enzymes nucléiques microbiennes. Le retrait de l'eau par lyophilisation empêche le fonctionnement de ces enzymes. La lyophilisation est un processus où l'eau est retirée par sublimation à partir d'un échantillon congelé sous une contrainte de vide. Pendant une cinquantaine d'heures, le sol est soumis à des températures négatives (-80 °C) et en contrainte de vide poussé (0.01 mBar). L'échantillon ainsi dépourvu de son eau acquiert une stabilité dans les conditions de stockage choisies par le CRG. En effet, même après lyophilisation, le stockage à long terme en température négative permet de conserver l'information liée à l'ADN

et à l'ARN. La lyophilisation présente un double avantage : elle permet à la fois de stabiliser l'échantillon et de pouvoir travailler sur un échantillon pour lequel la prise d'essai se fait sur la masse sèche. Cela permet de faire voyager des échantillons d'un pays à l'autre dans un délai raisonnable tout en assurant une bonne conservation de l'information génétique.

Le CEES et GenoSol, des infrastructures en relation étroite

Le Réseau de Mesures de la Qualité des Sols (RMQS <https://www.gissol.fr/le-gis/programmes/rmqs-34>) est un outil de surveillance des sols à long terme. Les sols évoluent constamment sous l'effet de grands facteurs naturels et sous l'effet des activités humaines (usages, aménagements fonciers, pratiques agricoles, épandages de boues, retombées atmosphériques, pollutions accidentelles...). Ces évolutions d'origine anthropique sont, la plupart du temps, préjudiciables au maintien de la qualité des sols. Elles sont le résultat de processus longs et cumulatifs, difficilement détectables et dont certains sont parfois irréversibles à l'échelle de temps humaine. Le maintien de la qualité des sols rend indispensable de détecter, de façon précoce, l'apparition et les tendances de ces évolutions, à l'aide de programmes d'observation et de suivi de la qualité

des sols. Depuis l'an 2000, le RMQS répond à ces objectifs d'évaluation et de suivi à long terme de la qualité des sols de France (Figure 6). Le RMQS repose sur le suivi de 2 240 sites répartis uniformément sur le territoire français (métropole et outre-mer), selon une maille carrée de 16 km de côté. Des prélèvements d'échantillons de sols, des mesures et des observations sont effectués, en moyenne, tous les quinze ans au centre de chaque maille. La première campagne de prélèvement en métropole (RMQS1) s'est déroulée de 2000 à 2009 et a permis la mise en place de 2 170 sites. La deuxième campagne métropolitaine (RMQS2) a débuté en 2016 et s'étend jusqu'en 2027. Le RMQS couvre également les départements d'Outre-mer, avec 70 sites répartis aux Antilles, à la Réunion, à Mayotte et en Guyane. L'évaluation et le suivi de la qualité des sols sont fondés sur l'analyse de propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols, associées à la recherche des sources de contamination diffuse et à la connaissance de l'historique de l'occupation et des pratiques de gestion de chaque site. De nouveaux paramètres ont été ajoutés, afin de mieux évaluer la sensibilité des sols en contexte de changement climatique (réserve utile, matières organiques particulières, stocks de carbone profond). Des perspectives d'adosser au RMQS un programme de phytopharmacovigilance dans les sols et un réseau de surveillance de la biodiversité du sol (faune, flore, microorganismes bactériens et fongiques) sont à l'étude. Au total, ce sont 5 à 20 kg de terre par échan-

Exemple de complémentarité des laboratoires autour d'un même programme et d'un même échantillon composite de sol: le Réseau de Mesures de la Qualité des Sols (RMQS)

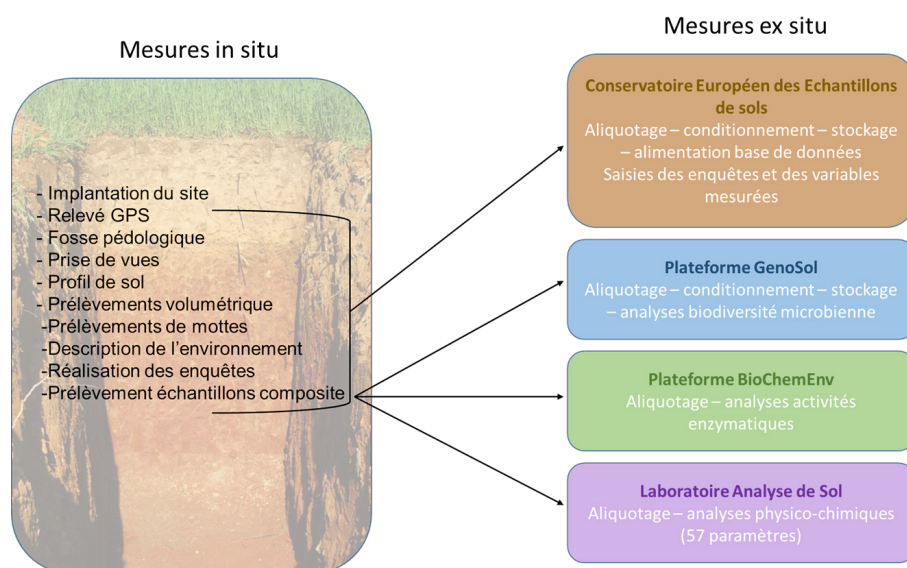


Figure 6. Ensemble de l'offre de service des plateformes « sol » d'INRAE

tillon qui sont envoyés et stockés au CEES, et 500 g à GenoSol. Ce type de programme de grande envergure intéresse nombre de champs thématiques et voit son aire d'influence augmenter au gré des appels d'offres. Pourtant, l'équipe de base reste la même.

La banque d'échantillons ainsi constituée permet d'accéder à un ensemble d'échantillons géoréférencés et représentatifs de la variété des sols français et de leurs occupations, lui conférant un caractère hautement patrimonial.

Perspectives des infrastructures

Au niveau du CEES, la quantité de matériel géré a mis en évidence des besoins d'évolution dans l'archivage des échantillons. Une réflexion est en cours pour essayer d'automatiser la sortie des échantillons et éviter ainsi des manipulations humaines, notamment le port de lourdes charges. Cette innovation permettrait d'optimiser la place et le contrôle des conditions de stockage. Un projet d'agrandissement avec un bâtiment enterré moins énergivore, associant stockage souterrain et bureaux à la surface, est en cours de réflexion.

Si l'ambition actuelle des deux structures CEES et CRG GenoSol est orientée vers la conservation à long terme des échantillons environnementaux, il leur tient à cœur de pouvoir mesurer l'impact de la conservation sur les informations contenues dans ces sols. Pour ce faire, chaque structure analyse un même échantillon, pour comparer ses caractéristiques et/ou sa structure, à des temps de conservation différents. Ces processus de vérification sont cependant coûteux en temps et en ressources et nécessiteraient donc d'être soutenus par les tutelles.

Le CRG GenoSol est en cours de déploiement d'une solution de traçabilité qui remplacerait le système d'informations actuel. Ce LIMS (Laboratory Information Management System) est commun aux laboratoires avec lesquels Geno-

Sol travaille régulièrement (BioChemEnv et le LAS d'Arras) et permettrait, avec un même outil, de centraliser dans une même base de données tous les paramètres mesurés sur un même échantillon.

Quant au CEES, il étudie la faisabilité d'utiliser ce LIMS en partie à la place de la base de données actuelle ou en complément de celle-ci. L'idée étant, pour le département AgroEcoSystem, de faciliter la communication entre ses différents laboratoires et plateformes ainsi que les envois d'échantillons ou les mises en communs de résultats d'analyses. L'unité InfoSol ayant une BdD déjà bien éprouvée et qui contient toutes les données pédologiques correspondantes aux échantillons, nous devons nous assurer qu'il n'y aura pas de doublonnage.

Enfin, la plateforme GenoSol, dans le cadre du Contrat Plan État Région sur la période 2021-2027, va lancer le projet Culturomics (CPER 2021-2027). Le développement de cette activité se fera en étroite collaboration avec les équipes de l'UMR Agroécologie. Elle vise à développer une nouvelle activité, au sein de la plateforme GenoSol, qui reposera sur des approches «single cell» et de «culturomics». L'objectif est de développer un pipeline analytique à même de proposer une offre novatrice visant à : (i) isoler des consortia et isolats microbiens des sols, (ii) caractériser fonctionnellement les consortia et isolats microbiens par des approches métagénomiques (séquençage shotgun), métatranscriptomiques et métabolomiques et (iii) les stocker dans la collection de microorganismes d'intérêt agro-environnemental de l'UMR Agroécologie (Centre de Ressource Biologique). Le développement de cette activité permettra d'exploiter la diversité microbienne des sols dans des approches d'ingénierie écologique, indispensables à la transition écologique de l'agriculture, et d'alimenter le CIRM ou tout autre CRB en espèces microbiologiques candidates pour des approches de détoxification, de biocontrôle ou d'ingénierie métabolique. ■



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Cryoconservation d'apex de *Solanum tuberosum* et espèces apparentées par la technique de vitrification en gouttes

Catherine SOUCHET¹
Florence ESNAULT¹
Jean-Eric CHAUVIN¹

CORRESPONDANCE

catherine.souchet@inrae.fr

RÉSUMÉ

Le CRB BrACySol conserve 12 000 accessions de *Solanum tuberosum* et espèces apparentées. La préservation de ces clones est essentielle pour la recherche sur cette espèce. Pour sécuriser, à long terme, la conservation de certains de ces clones, nous avons opté pour la cryoconservation d'apex. Nous avons choisi la méthode de vitrification en goutte en utilisant la solution PVS2 (Plant Vitrification solution 2). Pour *Solanum tuberosum*, nous avons obtenu des résultats satisfaisants avec un taux de régénération moyen de 89 %. Ce taux nous permet d'utiliser cette méthode en routine pour cette espèce. Pour les espèces apparentées, le taux peut varier, selon les génotypes, au sein d'une même espèce. Mais cette méthode nous a permis de valider la cryoconservation de clones appartenant à 21 des 23 espèces testées.

MOTS-CLÉS

Solanum tuberosum, espèces apparentées, cryoconservation, vitrification en goutte, PVS2 (Plant Vitrification solution 2).

¹ INRAE, UMR 1349 Institut de génétique environnement et protection des plantes, F-29260 Ploudaniel, France.

Apex cryopreservation of *Solanum tuberosum* and related species using the droplet vitrification technique

Catherine SOUCHET¹
Florence ESNAULT¹
Jean-Eric CHAUVIN¹

CORRESPONDENCE

catherine.souchet@inrae.fr

ABSTRACT

BrACySol BRC conserves 12,000 accessions of *Solanum tuberosum* and related species. The preservation of these clones is essential for research on this species. To secure the long-term preservation of certain of these clones, we have opted for apex cryopreservation and the droplet vitrification method using the Plant Vitrification solution 2 (PVS2).

Regarding *Solanum tuberosum*, we have obtained satisfactory results with an average regeneration rate of 89%. This rate allows us to use this method routinely for this species. Regarding the related species, the rate can vary according to certain genotypes within the same species. Nonetheless, this method has allowed us to validate the cryopreservation of clones belonging to 21 of the 23 species tested.

KEYWORDS

Solanum tuberosum, related species, cryopreservation, droplet vitrification, PVS2 (Plant Vitrification solution 2).

¹ INRAE, UMR 1349 Institut de génétique environnement et protection des plantes, F-29260 Ploudaniel, France.

Introduction

Un des défis actuels de la recherche et de l'agriculture est la sauvegarde de la diversité génétique pour répondre aux changements climatiques, aux besoins actuels et futurs, aux évolutions des techniques culturales et industrielles ainsi qu'aux réglementations environnementales.

Le CRB BrAcYsol, porté par les unités INRAE IGEPP et RGCO sur le site de Ploudaniel (Finistère), héberge des espèces à propagation végétative appartenant aux genres : *Allium*, *Cynara* et *Solanum* et des espèces à multiplication par graines du genre *Brassica*. Les ressources génétiques de *Solanum* tubéreux représentent environ 12 000 clones appartenant à 32 espèces différentes. Ces pommes de terre et espèces apparentées peuvent être conservées sous forme de tubercules, qui devront être replantés chaque année au champ ou en serre, ou sous forme de boutures *in vitro*, qui devront être repiquées tous les 15 mois.

La charge de travail que représente le maintien de cette collection, les risques de pertes dues aux bioagresseurs, les problèmes climatiques et la diminution du personnel nous ont incités à réfléchir à une méthode de conservation à long terme.

Nous avons recherché une méthode facile à mettre en place, limitant les risques liés aux manipulations, préservant les plantes des contaminations et donnant des plantes conformes à la plante mère.

Nous avons opté pour la cryoconservation d'apex. Cette méthode de conservation à -196°C dans l'azote liquide stoppe toutes les réactions biochimiques, mais doit être précédée de différentes étapes afin de préserver la viabilité des cellules. Du fait de la teneur en eau très importante des cellules, la congélation peut provoquer la mort de ces cellules, lors de leur déshydratation et de la cristallisation de l'eau. Elle peut modifier la structure des membranes. Le stress inhérent à cette technique peut perturber le métabolisme cellulaire.

Pour initier ce travail nous avons bénéficié, en 2003, du soutien financier de l'ex. Bureau des ressources génétiques (BRG) qui nous a permis d'acquérir l'équipement nécessaire.

De 2009 à 2012, nous avons participé au projet Cryoveg financé par le GIS IBISA. Ce projet nous a permis d'échanger avec d'autres utilisateurs de techniques de cryoconservation, d'effectuer un stage à l'IRD de Montpellier pour nous familiariser avec différentes techniques de cryoconservation et nous a apporté un soutien financier pour poursuivre nos travaux.

Nos travaux ont ensuite été soutenus par l'UMT INNOPLANT, de 2012 à 2014, et par le GIS IBISA, de 2014 à 2015, dans le cadre du projet SecureBracysol.

Nous avons expérimenté différentes méthodes :

- **"Droplet Freezing"** (Mix et al., 1984), méthode qui a été abandonnée car, dans nos conditions, les plantes obtenues n'étaient pas conformes au champ.
- **Encapsulation-déshydratation** (Fabre et Dereuddre, 1990), méthode qui a aussi été abandonnée car, dans nos conditions, le taux de régénération était très lié au génotype et les résultats peu répétables.
- Finalement, nous avons opté pour la technique de **« Droplet-vitrification »** (Kim et al., 2006) ou vitrification en goutte que nous utilisons actuellement en routine pour cryoconserver les clones de *Solanum tuberosum*.

Afin de valider la méthode « Droplet-vitrification », la conformité des plantes cryoconservées a été vérifiée en réalisant des notations sur 12 mériclones par clone. Ces observations ont été effectuées au champ, pour les variétés issues de *S. tuberosum*, et en serre, pour les espèces apparentées. Nous avons utilisé 22 descripteurs (levée, hauteur, vigueur, niveau de ploïdie, fertilité, etc.).

Notre objectif, dans un premier temps, est de cryopréserver la collection nationale de pomme de terre, la core collection définie de façon à capturer la diversité allélique de la collection de variétés maintenue au sein du CRB BrAcYsol (Esnault et al., 2016) ainsi que les clones, les plus précieux et les plus difficiles à maintenir, issus des travaux de notre équipe.

Matériels et méthode

En préambule de la cryoconservation des accessions de *Solanum*, nous avons déterminé le nombre d'apex à cryoconserver par clone (100/clone) et le taux de régénération acceptable (60 %) pour sécuriser et valider la cryoconservation d'un clone (Dussert et al, 2003).

Pour respecter les durées des différentes étapes, nous travaillons sur 2 lots de 60 apex par clone. Pour chaque lot, nous cryoconservons 10 à 12 apex témoins (1 boîte de Petri). Ces apex témoins, décongelés au moment de la mise en place, nous permettent de contrôler le taux de survie et de régénération du clone en cours de cryoconservation.

Avant la cryoconservation de chaque clone, nous contrôlons l'état sanitaire, en effectuant des tests ELISA pour vérifier l'absence des virus PVA, PVM, PVX, PVY, PVS et PLRV.

Nous réalisons également un profil moléculaire de ce clone avec les 8 marqueurs SSR qui constituent le kit « Identification variétale » développé par la FN3PT (Marhadour et al, 2014).

Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est conservé au sein de CRB BrACySol. Nous avons utilisé cette méthode pour cryoconserver :

- 78 clones de *Solanum tuberosum*
- 58 clones appartenant à 23 espèces apparentées (Tableau 1).

Préparation des milieux et réactifs

Les milieux utilisés sont les suivants :

- Milieu Tendille et Lecerf modifié
- Milieu M1 Cryo (Prétraitement) et milieu M2 Cryo (Reprise) utilisés à l'IRD pour les apex d'igname
- Milieu El Cryo
- Solution de vitrification PVS2
- Solution de charge
- Solution de rinçage

Ils sont préparés selon les fiches en annexe 1.

Les milieux gélosés sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 min, à 1 bar. Les solutions sont stérilisées en unité de filtration avec des filtres de 0,45 µm.

Préparation des plantes avant le prélèvement des apex

Les plantes *in vitro* sont repiquées au minimum 2 fois, à 3 semaines d'intervalle, en bocaux, sur le milieu Tendille et Lecerf modifié. Selon le génotype choisi et sa sensibilité à l'hygrométrie, on utilisera des bocaux à couvercles aérés (coton) ou non. Lors du dernier repiquage, seules des boutures terminales sont réalisées afin d'obtenir des plantes fortes et homogènes.

Six jours avant le prélèvement des apex, la partie haute des plantules (2/3 de la hauteur) est prélevée. Les feuilles et les pétioles sont éliminés en tirant vers le bas de la bouture. Les apex terminaux sont éliminés. Quatre à cinq tronçons de 0,5 cm avec un seul œil sont coupés et repiqués dans une boîte de Petri de 90 mm de diamètre, contenant 20 ml

Tableau 1 : Nombre de clones cryoconservés, validés par espèce

GRUPE GÉNÉTIQUE	ESPÈCE	NOMBRE DE CLONES CRYOCONSERVÉS	NOMBRE DE CLONES CRYOCONSERVÉS VALIDÉS	TAUX MOYEN DE SURVIE	TAUX MOYEN DE RÉGÉNÉRATION
Clade 1-2	<i>S. brachistotrichum</i>	4	1	95	95
	<i>S. bulbocastanum</i>	3	3	91	78
	<i>S. polyadenium</i>	7	4	100	91
	<i>S. trifidum</i>	4	4	97	84
Clade 4 Espèces Cultivées	<i>S. tuberosum</i>	78	72	98	90
	<i>S. andigenum</i>	1	1	100	90
	<i>S. chaucha</i>	1	1	95	95
	<i>S. phureja</i>	1	1	100	90
	<i>S. stenotomum</i>	1	1	100	94
Clade 4 Nord	<i>S. demissum</i>	1	1	100	78
Clade 4 Sud	<i>S. alandiae</i>	6	5	97	89
	<i>S. albicans</i>	1	1	83	79
	<i>S. berthaultii</i>	1	1	100	82
	<i>S. chacoense</i>	2	1	100	83
	<i>S. fendleri</i>	6	5	95	79
	<i>S. kurtzianum</i>	1	1	95	97
	<i>S. gourlayi</i>	2	0		
	<i>S. oplocense</i>	4	2	100	81
	<i>S. polytrichon</i>	3	3	95	91
	<i>S. sparsipilum</i>	1	0		
	<i>S. spegazzinii</i>	1	1	100	89
	<i>S. stoloniferum</i>	4	4	98	89
	<i>S. tarijense</i>	1	1	100	83
	<i>S. verneii</i>	1	1	100	80
	Espèce inconnue (69. 56. 52)	1	1	100	91
		118	104		

de milieu Tendille et Lecerf modifié, en conservant la polarité du fragment.

Prélèvement des apex axillaires et préculture

La loupe binoculaire est placée sous la hotte, après désinfection à l'alcool. Avec une aiguille stérile, les apex composés du dôme méristématique, recouvert partiellement de 2 ébauches foliaires (0,5 à 1,5 mm), sont prélevés (Figure 1) et déposés dans une boîte de Pétri de diamètre 55 mm, contenant 10 ml de milieu de prétraitement M1 (12 apex par boîte). Les boîtes de Pétri sont placées, à l'obscurité, dans un papier aluminium, pendant 1 jour, à 21 °C.

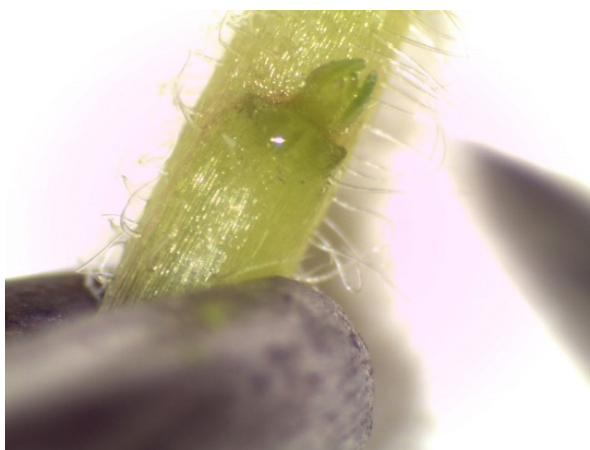


Figure 1. Prélèvement d'apex

Vitrification et congélation

Les apex sont ensuite déposés dans la solution de charge durant 20 minutes, dans un couvercle de tube Eppendorf stérile, à l'aide de la pointe d'un scalpel. Cette solution, contenant du saccharose et du glycérol, permet une déshydratation partielle des tissus.

De petits papiers aluminium, de 25 mm de long sur 8 mm de large, sont préparés. Leur bonne conductivité thermique permettra un refroidissement ou un réchauffement rapide des apex.

Chaque petit papier aluminium sera corné afin de faciliter son transport avec une pince.

Puis, sur chaque petit papier aluminium, 10 gouttes (8 µl) de solution de vitrification PVS2 (Sakai A, 1990) sont disposées (Figure 2). Cette solution, composée de 30 % (w/v) de glycérol, 15 % (w/v) d'éthylène glycol, 15 % (w/v) de DMSO (Diméthyle sulfoxyde) et 0,4 M de saccharose, a un rôle cryoprotecteur en permettant la transition vitreuse de l'eau résiduelle à -115 °C (Gallard, 2008).

Les petits papiers aluminium sont placés dans une boîte de Petri.

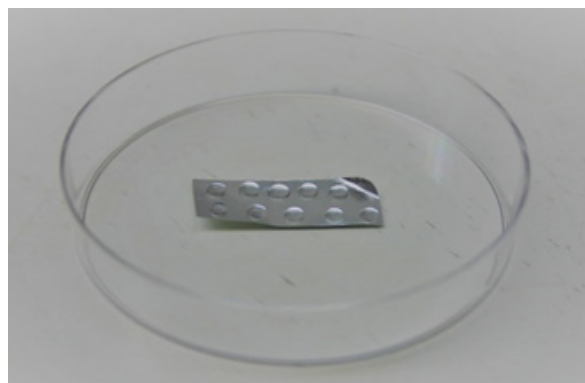


Figure 2. Gouttes de solution PVS2 sur papier aluminium

Dans chaque gouttelette, un apex est déposé à l'aide de la pointe du scalpel ou de l'aiguille, et la boîte de Petri est placée sur de la glace durant 30 minutes. Le faible volume de PVS2 entourant l'apex favorisera aussi un refroidissement rapide.

Chaque papier aluminium est ensuite glissé, à l'aide d'une pince, dans un cryotube (Figure 3) qui sera plongé et maintenu dans l'azote liquide puis transféré dans le cryoconservateur.



Figure 3. Transfert des apex dans un tube de cryoconservation

Décongélation

Les apex sont décongelés en plongeant chaque papier aluminium dans 5 ml de solution de rinçage contenus dans une boîte de Pétri (diamètre 55 mm), placée au bain marie à 40 °C. La solution rinçage riche en saccharose (1,2 M) permet d'éliminer les cryoprotecteurs.

La décongélation rapide des apex se fait par un passage de -196 °C à 40 °C, au bain-marie, durant 30 secondes, puis à température ambiante durant 20 minutes.

Repiquage pour régénération

Les apex sont repiqués, par 10, sans séchage, en boîtes de Pétri de diamètre 55 mm, contenant 10 ml de milieu M2 et placées une semaine à 21 °C, à l'obscurité, enveloppées dans un papier aluminium.

Ils sont ensuite repiqués, chaque semaine, sur un milieu de régénération EI (Figure 4). Les boîtes parafilmées sont placées, en boîte cristal, à 21 °C avec 16 h d'éclairage. Après 2 semaines sur le milieu de régénération, le taux de survie est évalué. Lorsque les régénérations atteignent 1 cm, elles sont repiquées, en tube, sur le milieu Tendille et Lecerf.



Figure 4. Régénération des apex

Validation des lots après cryoconservation

Afin de valider la cryoconservation d'un clone, nous calculons le taux de survie et le taux de régénération des apex.

Le taux de survie, calculé 15 jours après la décongélation, correspond au nombre d'apex verts après 2 repiquages sur le milieu EI.

Le taux de régénération correspond au nombre de plantules viables, 4 à 12 semaines après la décongélation des apex, par rapport au nombre d'apex repiqués après décongélation.

La viabilité et la conformité des plantules ainsi que l'observation de leur état sanitaire, après repiquage en tube, permettent de confirmer la validation des lots placés dans le cryoconservateur.

Résultats

L'objectif de ce travail était de mettre au point, au sein de notre laboratoire, une technique de cryoconservation et de vérifier qu'elle était applicable à différents clones de *Solanum tuberosum* et à des clones de différentes espèces apparentées de *Solanum*.

Applicabilité de la technique utilisée

Sur les 136 clones testés, toutes espèces confondues, nous avons validé la cryoconservation de 116 clones (Tableau 1).

Sur les 24 espèces testées, seules 2 espèces appartenant au Clade 4 Sud n'ont aucun clone validé (Tableau 1) :

- *S. sparsipilum* : le clone, cryoconservé à 2 reprises, a un taux moyen de survie de 100 % et un taux moyen de régénération de 42 %. Des apex témoins, ayant subi toutes les étapes sauf le passage dans l'azote liquide, ont un taux de régénération de 60 %.
- *S. gourlayi* : le premier clone, cryoconservé 2 fois, a un taux moyen de survie de 96 % et un taux moyen de régénération de 34 % ; le second clone, cryoconservé à 6 reprises, a un taux moyen de survie de 82 % et un taux moyen de régénération de 17 %. Les témoins, sans passage dans l'azote liquide, ont un taux de régénération respectivement de 50 et 28 %.
- Au total, la cryoconservation de 20 clones, répartis dans les différents clades, n'a pas pu être validée :
 - 10 clones n'ont pas atteint le taux minimum de régénération de 60 % pour sécuriser la cryoconservation.
 - 7 clones avaient un taux de régénération supérieur à 60 %, mais avec une contamination bactérienne au sein des boîtes témoin.
 - 3 clones n'ont pas atteint le taux minimum de régénération de 60 % et présentaient une contamination bactérienne.

Cryoconservation de *S. tuberosum*

La diversité génétique de la collection de variétés, maintenue au sein du CRB BrACySol, est bien représentée dans le panel des variétés intégrées dans cette étude. En effet, ce panel comprend les 48 variétés de la core collection définie pour représenter la diversité allélique de cette collection (Esnault et al., 2016).

Le taux de survie moyen des 78 variétés de *Solanum tuberosum* est de 98 % et le taux de régénération est de 89 %. Un total de 72 variétés de *Solanum tuberosum* sont considérées cryoconservées.

Ainsi, 6 variétés n'ont pas été validées. Deux (Ratte et Christa) n'ont pas atteint le taux minimum de régénération de 60 % pour sécuriser la cryoconservation. Les témoins de ces variétés, sans passage dans l'azote liquide, avaient un taux de régénération de 36 %.

Quatre clones avaient un taux de régénération supérieur à 60 %, mais avec une contamination bactérienne au sein des boîtes témoins.



Figure 5. Taux de survie et de régénération des variétés de *Solanum tuberosum*

Conclusion

L'adaptation de la méthode de vitrification en goutte, au sein de notre laboratoire, la mise au point des différentes étapes préalables à la cryoconservation, telles que la préparation des plantules in vitro, la détermination de la taille optimale des apex ainsi que la mise au point d'un milieu de régénération nous ont permis d'obtenir des résultats qui nous confortent dans le choix de cette méthode.

Globalement, cette méthode permet la survie d'apex de tous les clones cryoconservés. Le plus faible taux de survie obtenu étant de 54 %.

En 2016, le CIP (Centre international de la pomme de terre) obtenait, pour des clones de *Solanum tuberosum*, avec la méthode de vitrification en goutte précédée de 2 semaines de préculture à 6 °C, un taux de survie moyen de 72 % et un taux de régénération de 59 %. Le CIP a travaillé également

sur 3 autres espèces, communes à notre liste, mais sur un nombre d'accessions beaucoup plus important que nous. Pour les espèces *Solanum chaucha*, *S. phureja* et *S. stenotomum*, ils ont obtenu des taux moyens de survie compris entre 63 et 66 % et un taux de régénération compris entre 47 et 53 % (Vollmer et al., 2016). Nous avons donc obtenu des taux de survie et de régénération supérieurs aux leurs.

Le faible nombre de clones cryoconservés, au sein de chaque espèce apparentée, ne permet pas de déterminer l'aptitude à la cryoconservation, par la méthode de vitrification en goutte, de ces espèces, ni de relier les taux de régénération des clones au groupe génétique auquel ils appartiennent.

Les témoins sans passage dans l'azote liquide, des clones testés de *S. sparsipilum* et de *S. gourlayi* ainsi que des 2 variétés récalcitrantes de *S. tuberosum* (Ratte et Christa), ont aussi un taux de régénération faible.

Pour ces clones, nous pourrions tester de nouveaux équilibres hormonaux dans le milieu de régénération.

Pour tous les clones récalcitrants, il faudra revoir différentes étapes de cette méthode, comme le temps d'exposition à la solution PVS2 ou la durée du bain dans la solution de rinçage. Ainsi, on pourrait augmenter la durée du bain de rinçage (passer de 20 à 40 min), afin d'être sûr d'avoir éliminé les cryoprotecteurs qui peuvent s'avérer toxiques pour les apex après la décongélation.

Si, toutefois, ces modifications ne s'avéraient pas suffisantes pour les espèces apparentées, nous pourrions, pour ces clones, accepter un taux de régénération minimum de 40 % (Reed, 2001).

Dix clones ont présenté des contaminations bactériennes. Lors de la préparation des plantules *in vitro*, les bocalux présentant des bactéries sont éliminés. Ainsi, ces bactéries, non

visibles et non pathogènes pour les clones, semblent endogènes. Lors de la cryoconservation, l'apex subit un stress qui l'affaiblit. Après décongélation, la reprise de l'activité cellulaire peut être lente ce qui semble favoriser la multiplication bactérienne. Certains méristèmes arrivent malgré tout à régénérer une plante, d'autres pas.

Il nous faudra dorénavant nous assurer de l'absence de bactéries, sinon les éliminer ou refaire une mise en culture *in vitro* à partir de plants sains.

La méthode de vitrification en goutte est adaptée à notre problématique de conservation à long terme des ressources génétiques *Solanum* et peut être utilisée en routine pour de nombreuses espèces dont *Solanum tuberosum*. Toutefois, elle devra faire l'objet d'amélioration pour être utilisée pour certains clones récalcitrants. ■

Références

- Dussert S., Engelmann F., Noirot M., 2003. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *Cryo-letters* : 24, 149-160.
- Esnault F., Pellé R., Dantec J.-P., Bérard A., Le Paslier M.-C., Chauvin J.-E., 2016. Development of a potato cultivar (*Solanum tuberosum* L.) core collection, a valuable tool to prospect genetic variation for novel traits. *Potato Research*, 59, 4 : 329-343. DOI 10.1007/s11540-016-9332-x.
- Fabre J. and Dereuddre J., 1990. Encapsulation dehydration - A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *Cryo-Letters* 11(6) : 413-426.
- Gallard A., 2008. Étude de la cryoconservation d'apex en vue d'une conservation à long terme de ressources génétiques végétales : Compréhension des phénomènes mis en jeu et évaluation de la qualité du matériel régénéré sur le modèle Pélargonium. Thèse de doctorat. École doctorale d'Angers.
- Huang B., Ruess H., Liang Q., Colleoni C., Spooner D., 2019. Analyses of 202 plastid genomes elucidate the phylogeny of *Solanum* section *Petota*. *Scientific Reports* 9 : 44-54.
- Hawkes J. G., 1990. The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press, London.
- Marhadour S., Dargier C., Esnault F., Laversin N., Méar A., Perramant M. and Le Hingrat Y., 2014. Construction d'une base de données multi-utilisateurs pour améliorer la gestion des empreintes génétiques des variétés de pomme de terre produites en plants. *FranceInnovations Agronomiques* 35 : 161-172.
- Mix-Wagner G., 1999. The conservation of potato cultivars. *Potato Research* 42: 427- 436.
- Murashige T. and Skoog F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Kim H. H., Yoon J. W., Park Y.E., Cho E.G., Sohn J.K., Kim T.S., Engelmann F (2006). Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species : Critical factors in droplet vitrification. *Cryo-letters* 27(4) : 223-234.
- Reed B (2021). Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryo-letters* 22: 97-104.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama L (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange by vitrification. *Plant cell reports* vol 9: 30-33.
- Sakai A, Engelmann F (2007). Vitrification, encapsulation-Vitrification and droplet-vitification : A review. *Cryo-letters* 28(3): 151-172.
- Spooner D., McLean K., Ramsay G., Waugh R., Bryan G. J., 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: N°41.
- Spooner D., 2009. DNA barcoding will frequently fail in complicated groups : An example in wild potatoes. *American journal of botany* 96(6) : 1177-1180.
- Tendille C. and Lecerf M., 1974. La multiplication végétative de l'asperge (*ASPARAGUS OFFICINALIS* L.). Action de divers facteurs en particulier la nutrition minérale, sur le développement des méristèmes d'asperge, sur la croissance des plantules issues de ces méristèmes et sur la production de plante adultes. *Annales Amélioration des plantes* 24 (3) : 269-282.
- Vollmer R., Villagaray R., Egúsqüiza V., Espirilla J., Garcia M., Torres A., Rojas E., Panta A., Barkley N. A., Ellis D., 2016. The potato cryobank at the International Potato Center (CIP): A model for long term conservation of clonal. *CryoLetters* 37(5), 318-329.

Annexe 1. Milieux de culture

Milieu de culture Tendille et Lecerf modifié

Tendille et Lecerf modifié

	SOLUTION MÈRE	POUR 1 LITRE
Macro-éléments KNO3	10x	100cc
Micro-éléments MS	1000x	1cc
Fer EDTA	50x	20cc
Vitamines MS modifiées	1000x	1cc
Myo inositol		100mg
Saccharose		25g
Agar Agar VWR		7g
pH: 5.8		

Macro-éléments KNO3

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE (X10) 1L
KNO3	26.90 g
NH4NO3	5.36 g
Ca(NO3)2 4H2O	4.72 g
Mg SO4 7H2O	4.186 g
KH2 PO4	2.74 g
KCL	3.50 g

Micro-éléments MS

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE (X1000) 1L
H3BO3	6.2 g
Mn SO4 H2O	16.9 g
Zn SO4 7 H2O	10.6 g
KI	0.83 g
Cu SO4 5 H2O	0.025 g
Co Cl2 6 H2O	0.025 g
Na2 MoO4 2 H2O	0.25 g

Vitamines de Murashige & Skoog modifiées

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE (X1000) 100ML
H2 NCH2 COOH	200mg
Vit B1	50 mg
Vit B6	50 mg
Vit B3	50 mg

Fer EDTA

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE (X50) 1L
SO4Fe 7H2O	1.39 g
NA2EDTA2H2O	2.37 g

Milieu de régénération (EI) :

milieu Tendille et Lecerf modifié avec l'équilibre hormonal suivant :

HORMONES	SOLUTION MÈRE	POUR 1L DE MILIEU
AIA	1mg / ml	100µl
GA3	1mg / ml	200µl
Zéatine riboside	1mg / ml	200µl

Ce milieu est autoclavé, avec les hormones, 20 min à 1 bar.

Milieux de culture utilisés à IRD Montpellier pour la préparation et décongélation des apex d'igname

Tous ces milieux et solutions sont préparés avec H₂O ultra pure.
Les pH des milieux sont ajustés à 5,75.

M1 : Milieu de pré-traitement

M2 : Milieu de reprise des apex après congélation

M1			M2		
	SOLUTION MÈRE	POUR 1 LITRE		SOLUTION MÈRE	POUR 1 LITRE
Macro-éléments MS IRD	20x	25cc	Macro-éléments MS IRD	20x	25cc
Micro-éléments MS IRD	100x	10cc	Micro-éléments MS IRD	100x	10cc
Fer EDTA IRD	1000x	10cc	Fer EDTA IRD	1000x	10cc
Vitamines IRD	1000x	1cc	Vitamines IRD	1000x	1cc
Myo inositol		100mg	Myo inositol		100mg
Saccharose		100g	Saccharose		100g
Charbon actif		2g	Charbon actif		2g
Agar Agar VWR		7g	BAP	1mg/L	2cc
			ANA	1mg/L	100µl
			Agar Agar VWR		7g

Macro-éléments MS

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE
NH ₄ NO ₃	33 g
KNO ₃	38 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	8.8 g
Mg SO ₄ 7H ₂ O	7.4 g
KH ₂ PO ₄	3.4 g

Oligo-éléments A

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE
H ₃ BO ₃	10000 mg
Mn SO ₄ H ₂ O	2500 mg
Zn SO ₄ 7 H ₂ O	1000 mg
KI	83 mg
Cu SO ₄ 5 H ₂ O	2.5 mg
Co Cl ₂ 6 H ₂ O	2.5 mg
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	2.5 mg

Vitamines IRD

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE (X1000) 100ML
Thiamine hydrochloride	100 mg
Pyridoxine hydrochloride	100 mg
Acide Nicotinique anhydre	100 mg
Pantothénate de calcium	100 mg

Fer EDTA

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE (X1000) 1L
SO ₄ Fe 7H ₂ O	2.49 g
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	2.61 g

Solutions pour la cryoconservation

Toutes ces solutions sont préparées avec H₂O ultra pure et stérilisées par filtration.

Solution de charge

	SOLUTION MÈRE	POUR 1 LITRE
Macro-éléments MS IRD	20X	100cc
Oligo-éléments A	100X	1cc
Fer EDTA IRD	1000X	20cc
Vitamines IRD	1000X	1cc
Myo inositol		100mg
Saccharose		0.4M=136.92
Glycerol		2M=184.18g
Ph : 5.8		

Solution de rinçage

	SOLUTION MÈRE	POUR 1 LITRE
Macro-éléments MS IRD	20X	100cc
Oligo-éléments A	100X	1cc
Fer EDTA IRD	1000X	20cc
Vitamines IRD	1000X	1cc
Myo inositol		100mg
Saccharose		1.2M=410.76
Ph : 5.8		
Ph : 5.8		

PVS2

	SOLUTION MÈRE	POUR 1 LITRE
Macro-éléments MS IRD	20X	25cc
Oligo-éléments A	100X	10cc
Fer EDTA IRD	1000X	10cc
Vitamines IRD	1000X	1cc
Myo inositol		100mg
Saccharose		0.4M=136.92
Glycérol		30% (w/v)
DMSO		15% (w/v)
Ethylène glycol		15% (w/v)
Ph : 5.75		



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Développement d'une core collection pomme de terre

Florence ESNAULT¹
Roland PELLÉ¹
Marie-Pierre CANN¹
Marie BOUSSEAU¹
Marie-Ange DANTEC¹
Catherine SOUCHET¹
Marie-Claire KERLAN¹
Jean-Eric CHAUVIN¹

CORRESPONDANCE

florence.esnault@inrae.fr

RÉSUMÉ

Le développement d'une core collection consiste à sélectionner, au sein d'une collection ayant un effectif plus ou moins important, un petit panel de génotypes qui représente la diversité génétique disponible dans la collection de départ, avec un minimum de redondance. Cette étude présente le développement d'une core collection de 48 génotypes, représentative de la diversité génétique d'un panel de 350 variétés tétraploïdes de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). Elle a été établie en utilisant des données de génotypage par marqueurs microsatellites (SSR) et la stratégie M qui maximise la diversité allélique. Cette core collection constitue un panel d'un grand intérêt qui a été exploité jusqu'à présent dans le cadre de deux projets de recherche : d'une part, pour évaluer la possibilité d'exploiter la puce SNP SolCAP pour caractériser les ressources génétiques maintenues au sein du CRB BrACySol, et, d'autre part, pour évaluer la variabilité structurale et morphologique des grains d'amidon de pomme de terre.

MOTS-CLÉS

Diversité génétique, *Solanum tuberosum*, marqueur microsatellite.

¹ INRAE, UMR IGEPP, Domaine de Keraïber, 29260 PLOUDANIEL.

Development of a potato core collection

Florence ESNAULT
Roland PELLÉ
Marie-Pierre CANN
Marie BOUSSEAU
Marie-Ange DANTEC
Catherine SOUCHET
Marie-Claire KERLAN
Jean-Eric CHAUVIN

CORRESPONDENCE

florence.esnault@inrae.fr

ABSTRACT

Developing a core collection consists in selecting, in a more or less large collection, a small panel of genotypes representing the genetic diversity available in the initial collection, with minimum redundancy. This study presents the development of a core collection of 48 genotypes representative of the genetic diversity of a panel of 350 tetraploid varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.). It was built using microsatellite marker genotyping data (SSR) and M strategy which maximizes allelic diversity. This core collection forms a panel of major interest that has been exploited up till now in the framework of two research projects: on the one hand to assess the possibility of exploiting the SNP SolCAP array to characterize the genetic resources maintained in BRC BrACySol, and on the other hand, to assess the structural and morphological variability of potato starch grains.

KEYWORDS

Genetic diversity, *Solanum tuberosum*, microsatellite marker.

Introduction

Les collections de ressources génétiques ont pour objectif de conserver la diversité génétique des espèces cultivées et apparentées. Elles sont constituées progressivement, au gré des programmes de recherche qui exploitent cette diversité pour des études taxonomiques ou à des fins d'amélioration génétique des plantes cultivées. Elles comprennent des échantillons provenant de missions de collecte, des génotypes créés dans les programmes de recherche, des variétés anciennes ou récentes (Van Treuren et al., 2009). La plupart de ces collections ont des effectifs importants, ce qui rend leur maintien et leur caractérisation coûteux et chronophages.

Ces difficultés peuvent être surmontées en sélectionnant un petit panel de génotypes aussi représentatifs que possible de la diversité génétique disponible avec un minimum de redondance. Ce concept a été proposé par Frankel et Brown (1984) sous le terme de « core collection ». Odong et al. (2013) ont identifié trois types de core collections en fonction de leur finalité : des core collections qui représentent (1) tous les génotypes de la collection initiale, (2) les génotypes extrêmes de cette collection ou (3) la distribution des génotypes dans cette collection. Les deux premiers types ont pour objectif de représenter la diversité génétique de la collection initiale, le troisième type représente le profil de distribution de la variabilité présente dans la collection initiale.

Des core collections ont été développées pour un grand nombre d'espèces sur la base de données passeport, de données agro-morphologiques ou de données moléculaires. Dans la plupart de ces études, l'échantillonnage est réalisé en se basant sur une analyse de structuration génétique de la collection initiale et en déterminant le nombre de génotypes à retenir dans chaque groupe (Franco et al., 2006). Schoen et Brown (1993) ont décrit une autre méthode, appelée stratégie M, dans laquelle les marqueurs moléculaires sont utilisés pour sélectionner les individus à inclure dans la core collection, en maximisant la richesse allélique de chaque marqueur. Franco et al. (2006) ont montré, chez le maïs, que cette méthode permettait d'obtenir les indices de diversité les plus forts.

En ce qui concerne la pomme de terre, différentes core collections ont été définies au sein des cultivars traditionnels andins appartenant à *Solanum tuberosum* groupe *Andigenum* (Huaman et al., 2000 ; Chandra et al., 2002 ; Gopal et al., 2013) ou à *S. phureja* (Ghislain et al., 1999), au sein des espèces sauvages *S. microdontum* (Bamberg et Del Rio, 2014) ou *S. demissum* (Del Rio et Bamberg, 2020). Gopal

et al. (2013) ont montré que la stratégie M permettait d'obtenir une meilleure couverture de la diversité que les méthodes basées sur la classification hiérarchique.

Le travail présenté ici a porté sur le développement d'une core collection représentant la diversité génétique du pool des variétés « modernes » de pomme de terre, cultivées hors d'Amérique du Sud. Cette core collection a été définie en exploitant des données de génotypage obtenues à partir de marqueurs microsatellites et en utilisant la stratégie M (Esnault et al., 2016). Des exemples d'utilisation de cette core collection sont également présentés.

Matériels et méthodes

Matériel végétal

Le Centre de Ressources Biologiques BrACySol (INRAE, UMR IGEP, Ploudaniel) conserve une grande collection de pommes de terre maintenues végétativement sous forme de clones. Cette collection comprend environ 1 200 variétés, anciennes ou récentes, originaires de différentes parties du monde. En utilisant les données phénotypiques disponibles dans la base de données Europotato (<http://www.europotato.org>), 350 variétés ont été sélectionnées de manière à représenter des phénotypes extrêmes pour 21 caractères morphologiques (descripteurs de la plante ou des tubercules), agronomiques ou technologiques. Ce panel de 350 variétés sera appelé collection initiale dans cet article.

Génotypage

Un total de 26 marqueurs microsatellites (SSR), développés par Kawchuk et al. (1996), Milbourne et al. (1998), Ghislain et al. (2004) ou Feingold et al. (2005) ont été sélectionnés pour leur niveau de polymorphisme et leur position sur le génome (Tableau 1). La collection initiale a été génotypée avec ces 26 marqueurs SSR. Le génotypage a été réalisé sur la plateforme Gentyane (INRAE, Clermont-Ferrand). Les allèles ont été identifiés par leur taille.

Définition de la core collection

Le logiciel MSTRAT v4.0 (Gouesnard et al., 2001), qui met en œuvre la stratégie M, a été utilisé. Les données de 15 marqueurs SSR ont été utilisées en tant que variables actives pour définir la core collection, et les données des 11 autres marqueurs SSR ont été utilisées en tant que variables cibles, pour tester l'efficacité de la méthode (Tableau 1). Les marqueurs SSR utilisés en tant que variables actives ont été choisis de manière à représenter chacun des chromosomes, et en tenant compte de leur niveau de polymorphisme et de la facilité de lecture des profils. Les génotypes porteurs

Tableau 1 : Liste des marqueurs SSR utilisés en variables actives ou variables cibles, nombre total d'allèles et nombre d'allèles rares révélés par chacun de ces marqueurs

VARIABLE	NOM DU SSR	CHROMOSOME	NB TOTAL D'ALLÈLES	NB D'ALLÈLES RARES
ACTIVE	STi043	1	7	2
	STi029	2	12	2
	STM3011	2	13	1
	STi050	3	9	1
	STM3016	4	9	1
	STP0Ac58	5	17	0
	STi059	6	12	1
	STM0031	7	18	1
	SSR1	8	13	3
	STM1016	8	10	0
	STi057	9	14	0
	STi023	10	17	2
	STM2005	11	9	4
	STi028	11	12	2
	STM1097	12	15	4
CIBLE	STM2030	1	3	0
	STi024	2	11	2
	STi060	3	4	0
	STi012	4	9	2
	STi006	5	16	0
	STM0028	7	14	2
	STi044	8	7	1
	STM1021	9	19	0
	STM1040	10	8	1
	STi018	11	10	1
	STi051	12	11	0

d'allèles rares (présents chez une seule variété) ont été inclus dans le noyau. Pour la sélection des autres variétés, 100 répétitions de 40 itérations ont été réalisées. La core collection qui présente la plus grande richesse allélique, pour les variables actives et les variables cibles, a été choisie.

Résultats

Au sein de la collection initiale de 350 variétés, chaque marqueur SSR a révélé entre 3 et 19 allèles, avec une moyenne de 11,5 allèles par marqueur (Tableau 1). Au total, 299 allèles différents ont été identifiés, dont 33 présents chez un seul génotype. Les 28 variétés avec ces 33 allèles

rares ont été intégrées dans la core collection. La plus petite core collection, qui inclut tous les allèles des variables actives (187 allèles), comprend 53 génotypes. Cette core comprend 96,6 % des allèles des variables cibles (112 allèles). Pour des raisons pratiques, liées aux formats de génotypage, la taille retenue pour la core collection a été de 48 génotypes. Toutefois, la core de 48 génotypes qui a été définie, appelée core 48, capte la majeure partie de la richesse allélique initiale, puisqu'elle comprend 99,5 % des allèles actifs et 96,9 % des allèles cibles. Son niveau élevé de diversité est confirmé par un taux d'hétérozygotie élevé ($H_0 = 0.75$).

Discussion

La diversité génétique présente au sein de la collection Pomme de terre du CRB BrACySol est très exploitée par la communauté scientifique et par les sélectionneurs (1 400 diffusions en moyenne par an). Cette collection a déjà été évaluée pour un certain nombre de caractères agro-morphologiques, en particulier pour la résistance à différents bioagresseurs ou pour des caractères de qualité du tubercule. Toutefois, les besoins futurs de l'agriculture demanderont d'évaluer la diversité disponible pour de nouveaux caractères, en lien par exemple avec le changement climatique ou de nouvelles utilisations. La caractérisation phénotypique et génotypique de grandes collections n'est pas toujours possible. La core 48 a été développée afin de disposer d'un panel sur lequel il peut être envisagé de faire une première analyse de diversité génotypique ou de variabilité sur des caractères agro-morphologiques nouveaux.

Ainsi cette core collection a été exploitée jusqu'à présent dans le cadre de deux projets de recherche.

Le premier projet avait pour objectif d'évaluer la possibilité d'exploiter la puce SNP SolCAP 8K pour caractériser les ressources génétiques maintenues au sein du CRB BrACySol. En effet, la puce SolCAP a été développée par une équipe américaine (Hamilton et al., 2011) à partir de données de séquençage de variétés américaines. Avant de l'utiliser sur de grands effectifs, il était important de s'assurer que les SNP positionnés sur cette puce étaient aussi

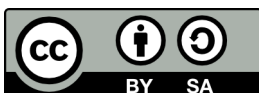
présents et polymorphes dans notre matériel végétal. Ainsi, la core 48 étant représentative de la diversité présente au sein de notre collection de variétés, elle constituait un panel de variétés intéressant pour faire cette analyse. Les résultats ont montré que la puce SolCAP était un outil pertinent pour caractériser nos collections et, depuis, elle a été utilisée sur 260 géniteurs améliorés dans le cadre du projet LDPot, financé par le métaprogramme SelGen et piloté par INRAE UMR IGEPP.

Le deuxième projet, porté par l'Institut Français des Matériaux AgroSourcés (Projet ANR PoStaTic), avait pour objectif d'étudier les caractéristiques de l'amidon de pomme de terre pour la production de bioplastiques. Une analyse de la variabilité structurale et morphologique des grains d'amidon de pomme de terre a ainsi été réalisée en évaluant les génotypes de la core 48 pour différents caractères : taille et forme des grains d'amidon, composition en amylose et amylopectine et structure de la chaîne d'amidon. Les résultats ont montré qu'il existait des différences significatives pour ces caractères au sein de la core 48. La caractérisation des grains d'amidon de pomme de terre a été poursuivie dans le cadre du projet ANR TapStar, piloté par la même équipe.

La core 48 s'est donc révélée être un outil d'un grand intérêt. Afin de conserver cette collection à long terme, elle a été intégrée dans la cryobanque qui est en cours de constitution au sein du CRB BrACySol (Voir article de C. Souchet et al. dans ce numéro). ■

Références

- Bamberg J, del Rio A (2014). Selection and Validation of an AFLP Marker Core Collection for the Wild Potato *Solanum microdontum*. *American Journal of Potato Research* 91: 368-375.
- Chandra S, Huaman Z, Krishna SH, Ortiz R (2002). Optimal sampling strategy and core collection size of Andean tetraploid potato based on isozyme data - a simulation study. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 1325-1334.
- Del Rio A., Bamberg J. (2020). A Core Subset of the ex situ Collection of *S. demissum* at the US Potato Genebank. *American Journal of Potato Research* 97: 505-512.
- Esnault F, Pellé R, Dantec JP, Bérard A, Le Paslier MC, Chauvin JE (2016). Development of a potato cultivar (*Solanum tuberosum* L.) core collection, a valuable tool to prospect genetic variation for novel traits. *Potato Research* 59, 4, 329-343. DOI 10.1007/s11540-016-9332-x.
- Feingold S, Lloyd J, Norero N, Bonierbale M, Lorenzen J (2005). Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 111: 456-466.
- Franco J, Crossa J, Warburton ML, Taba S (2006). Sampling strategies for conserving maize diversity when forming core subsets using genetic markers. *Crop Science* 46: 854-864.
- Frankel OH, Brown AHD (1984). Plant genetic resources today: a critical appraisal. In: Holden JHW and Williams JT (ed.) *Crop Genetic Resources: conservation and evaluation*. London: Georges Allen & Unwin Ltd, pp. 249-257.
- Ghislain M, Spooner DM, Rodriguez F, Villamon F, Nunez J, Vasquez C, Waugh R, Bonierbale M (2004). Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 881-890.
- Ghislain M, Zhang D, Fajardo D, Huaman Z, Hijmans RJ (1999). Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46: 547-555.
- Gopal J, Kumar V, Kumar R, Mathur P (2013). Comparison of Different Approaches to Establish a Core Collection of Andigena (*Solanum tuberosum* Group Andigena) Potatoes. *Potato Research* 56: 85-98.
- Gouesnard B, Bataillon TM, Decoux G, Rozale C, Schoen DJ, David JL (2001). MSTRAT: An algorithm for building germ plasm core collections by maximizing allelic or phenotypic richness. *Journal of Heredity* 92: 93-94.
- Hamilton JP, Hansey CN, Whitty BR, Stoffel K, Massa AN, Van Deynze A, De Jong WS, Douches DS and Buell CR (2011). Single nucleotide polymorphism discovery in elite north american potato germplasm. *Bmc Genomics* 12.
- Huaman Z, Ortiz R, Gomez R (2000). Selecting a *Solanum tuberosum* subsp andigena core collection using morphological, geographical disease and pest descriptors. *American Journal of Potato Research* 77: 183-190.
- Kawchuk LM, Lynch DR, Thomas J, Penner B, Sillito D, Kulcsar F (1996). Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. *American Potato Journal* 73: 325-335.
- Milbourne D, Meyer RC, Collins AJ, Ramsay LD, Gebhardt C, Waugh R (1998). Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Molecular and General Genetics* 259: 233-245.
- Odong TL, Jansen J, van Eeuwijk FA, van Hintum TJL (2013). Quality of core collections for effective utilisation of genetic resources review, discussion and interpretation. *Theoretical and Applied Genetics* 126: 289-305.
- Schoen DJ, Brown AHD (1993) Conservation of allelic richness in wild crop relatives is aided by assessment of genetic markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 10623-10627.
- Van Treuren R, Engels JMM, Hoekstra R, Van Hintum TJL (2009). Optimization of the composition of crop collections for ex situ conservation. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 7: 185-193.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Culture *in vitro*, assainissement et indexation de la Collection Igname du Centre de Ressources Biologiques Plantes Tropicales des Antilles

Yoana FAURE¹
Suzia GELABALE¹
Rose-Marie GOMEZ¹

CORRESPONDANCE

yoana.faure@inrae.fr

RÉSUMÉ

La culture *in vitro* regroupe un ensemble de techniques permettant de régénérer, multiplier, conserver et assainir des plantes entières à partir de fragments de tissus végétaux, sur milieu artificiel et en conditions contrôlées pour l'éclairage et la température. Elle permet au Centre de Ressources Biologique Plantes Tropicales (CRB PT) de conserver plusieurs centaines d'accessions d'ignames, de bananiers, d'ananas et de cannes à sucre sous forme de vitroplants, dans les laboratoires de culture *in vitro* des Centres INRAE et CIRAD en Guadeloupe et en Martinique. La conservation *in vitro* des ignames s'y effectue en quatre étapes : l'introduction à partir de tiges d'ignames contenant des méristèmes, la multiplication par micro-bouturage et l'assainissement par thérapie thermique et culture de méristème, suivie de l'indexation virale. Ainsi, le CRB PT a développé sur l'igname 13 tests RT-PCR permettant la détection des virus à ARN et un test IC-PCR permettant la détection d'un virus à ADN, appelé badnavirus, qui existe aussi sous forme intégrée dans le génome de l'igname. L'objectif final de ces différentes techniques est la conservation, puis la diffusion de vitroplants indemnes de virus aux agriculteurs, chercheurs et autres demandeurs à l'échelle nationale et internationale.

MOTS-CLÉS

Culture *in vitro*, igname, conservation, assainissement, indexation virale, CRB Plantes Tropicales.

¹ INRAE UR1321 ASTRO, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, France.

In vitro culture, sanitation and indexing of the Yam Collection of the Antilles Tropical Plant Biological Resource Center

Yoana FAURE¹
Suzia GELABALE¹
Rose-Marie GOMEZ¹

CORRESPONDENCE

yoana.faure@inrae.fr

ABSTRACT

In vitro culture covers a number of techniques used to regenerate, propagate, conserve and sanitize whole plants from fragments of plant tissue in artificial medium and under controlled lighting and temperature conditions. It allows the Biological Resource Center for Tropical Plant (BRC TP) to preserve several hundred accessions of yam, banana, pineapple and sugar cane, in the form of vitroplants in the *in vitro* culture laboratories of the INRAE and CIRAD centers in Guadeloupe and Martinique. The *in vitro* preservation of yams is performed in four steps: the introduction using stems of yams containing meristems, multiplication by micrografting and sanitation using thermotherapy and meristem culture, followed by viral indexing. Thus, the BRC PT has developed for yam 13 RT-PCR tests to detect RNA viruses and one IC-PCR test to detect a DNA virus called badnavirus which exists in integrated form in the yam genome. The final aim of these different techniques is the preservation and then dissemination of virus-free vitroplants to farmers, researchers, etc. at the national and international scales.

KEYWORDS

Vitroculture, yam, conservation, sanitation, viral indexing, BRC for Tropical Plants.

¹ INRAE UR1321 ASTRO, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, France.

Introduction

L'igname est une plante vivrière du genre *Dioscorea*, de la famille des *Dioscoreaceae*, qui regroupe environ 600 espèces (Degras, 1986). Elle produit des tubercules souterrains consommables pour les espèces domestiquées, des tiges volubiles et parfois des bulbes aériens qui peuvent également être consommés, mais qui sont préférentiellement utilisés comme semences. Bien que l'igname soit la troisième production en Guadeloupe, après la canne à sucre et la banane qui sont dédiées à l'exportation, sa production est en déclin. Elle est passée de 10 680 t en 2000 (FAOSTATS, 2021) à 2 157 t en 2019 (Agreste, 2020), soit une diminution de près de 80 % en presque 19 ans. Une des principales raisons est la sensibilité de cette culture aux bioagresseurs, comme le champignon responsable de l'anthracnose, les nématodes, mais également les virus (Barlagne *et al.*, 2017). La demande des consommateurs est donc en partie satisfaite par l'importation.

L'un des premiers objectifs du Centre INRA Antilles-Guyane, à sa création en 1949, était la constitution d'un stock de ressources végétales des Caraïbes. En tant que culture vivrière majeure, une collection d'ignames anciennes et traditionnelles a vu le jour dans la station d'amélioration des plantes, puis dans les jardins créoles des ouvriers agricoles du Centre. Certaines variétés ont une très grande valeur patrimoniale, car elles ont été apportées en Guadeloupe comme « plantes de garde » sur les bateaux transportant les esclaves venant d'Afrique à partir de 1674. La collection s'est ensuite enrichie des échanges de matériel au sein des Caraïbes, de prospections plus lointaines (Nouvelle-Calédonie, Côte d'Ivoire, Nigéria, etc.) et des programmes de création variétale.

À partir des années 1980, des chercheurs à l'INRA de Guadeloupe ont commencé à mener des travaux sur la culture *in vitro* d'igname (Lacointe & Zinsou, 1987 ; Arnolin, 1988 ; Arnolin *et al.*, 1989). L'objectif était de développer cette technique pour en faire une alternative au maintien et à la multiplication de l'igname au champ, dont le cycle de culture est de neuf mois avec une gestion de l'enherbement très chronophage. De plus, la culture *in vitro* nécessite moins d'espace et permet d'obtenir, en moins de temps, un grand nombre de plants, appelés vitroplants, d'une même accession. Pour la collection Igname, une accession est un entité immatérielle unique, identifiée par un code, un nom et des informations associées (par exemple, celles en lien avec son acquisition), et qui représente l'ensemble des échantillons obtenus par multiplication végétative d'un même génotype de départ.

Le CRB Plantes Tropicales a officiellement été créé en 2010. Il est composé de six collections dont quatre sont gérées par le CIRAD : Bananier, Canne à sucre, Manguier et Ananas, et deux sont gérées par INRAE : Igname et Herbier de Guadeloupe. Les missions de la collection Igname sont, entre autres, de conserver des variétés et de les assainir, pour pouvoir fournir aux professionnels et aux équipes de recherche du matériel végétal sain. Ces procédures s'appuient sur le laboratoire de culture *in vitro* pour la multiplication des vitroplants et l'élimination des virus, par thérapie et culture de méristème, et sur le laboratoire de biologie moléculaire pour l'indexation virale qui consiste à tester, par des outils de biologie moléculaire, la présence des virus infectant la plante.

La conservation *in vitro*

Il s'agit de conserver le matériel dans des conditions de culture (milieu, température, photopériode) réduisant la vitesse de croissance des plantes, limitant ainsi le nombre de repiquages. Les repiquages permettent de ne pas perdre les accessions, en régénérant de nouveaux vitroplants à partir des nœuds et en fonction du dépérissement des vitroplants et/ou de l'épuisement du milieu de culture.

Au 31 décembre 2020, la collection Igname comportait 433 accessions dont 418 en culture *in vitro*, soit 97 % de la collection. Cinq espèces sont majoritairement représentées : *Dioscorea trifida*, *Dioscorea alata*, *Dioscorea cayenensis-rotundata*, *Dioscorea esculenta* et *Dioscorea bulbifera*. L'objectif est d'avoir la totalité de la collection en culture *in vitro*, mais des pertes d'accessions sont possibles en raison de problèmes de contamination et de dysfonctionnements des infrastructures. Elles sont alors réintroduites quand il existe un double de sécurité, par exemple, conservé au champ (conservation *in vivo*). Pour des raisons de sécurisation du matériel et en lien avec l'utilisation de ces vitroplants (assainissement, multiplication pour fournitures, sevrages, etc.), un lot d'une même accession en culture *in vitro* est composé de 12 vitroplants portant le même identifiant.

L'introduction en culture *in vitro* à partir de tiges

L'introduction en conservation *in vitro* d'une accession se fait généralement à partir d'une tige issue d'un morceau de tubercule (semenceau) planté en chambre climatique, qui a poussé en conditions contrôlées : photopériode de 16 h et température de 25 °C. Le semenceau peut également avoir été planté en serre ou au champ, mais les chances de réussite sont plus faibles car les risques de

contamination sont plus élevés. La tige doit posséder environ 10 nœuds, pour ne pas être trop jeune ou au contraire trop développée (Figure 1).



Figure 1. A) Photo d'un plant d'igname cultivé en chambre climatique en attente d'une introduction en culture *in vitro*. B) Photo de deux nœuds sur la même tige.

La méthode utilisée (Figure 2) permet l'élimination des bactéries et des champignons que la plante peut contenir et qui empêcheraient le futur vitroplant de se développer. Dans la chambre climatique et à l'aide d'un scalpel, une dizaine de nœuds sont prélevés par accession et leurs feuilles sont retirées. Chaque morceau de tige portant au moins un nœud est une bouture. Toutes les boutures d'une même accession sont ensuite disposées dans un bocal, en veillant à reporter l'identifiant de chaque accession.

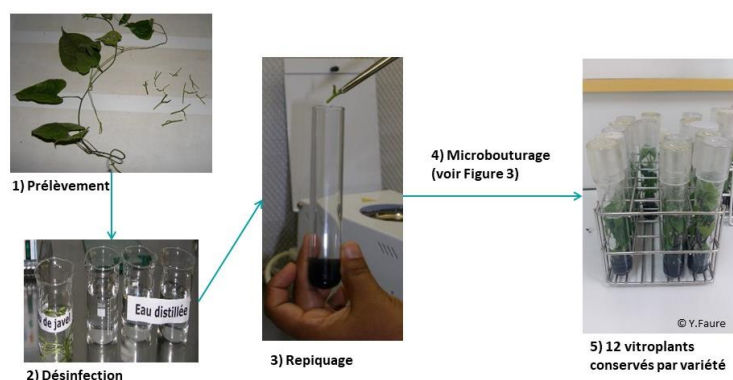


Figure 2. Étapes de bouturage de tige d'igname pour une introduction en culture *in vitro*

Le matériel est transféré dans le laboratoire de culture *in vitro* et de l'alcool à 70° est versé dans chaque bocal. La suite de la manipulation nécessite de travailler en milieu stérile sous une hotte à flux laminaire. Après 10 minutes de trempage, l'alcool est retiré, puis de l'eau de Javel à 2,6 % de chlore actif est versée dans le bocal pour réaliser un bain de 20 minutes. Cette désinfection est suivie de trois rinçages à l'eau déminéralisée stérile. Un premier rinçage rapide permet de retirer une grande partie de l'eau de Javel. Les deux rinçages suivants se font en laissant tremper les

boutures respectivement 10 minutes, puis 20 minutes, en renouvelant à chaque fois l'eau stérile.

Les boutures sont ensuite déposées sur un papier carton stérile. Les extrémités de chaque bouture, endommagées par l'eau de Javel, sont découpées à l'aide d'un scalpel stérile. Entre chaque accession, les outils (scalpels et pinces) sont désinfectés à l'aide d'un stérilisateur à bille. Les boutures sont ensuite placées dans un tube en verre contenant 10 mL de milieu de culture de croissance (Tableau 1), puis les tubes sont conservés en chambre de culture à 25 °C, avec une photopériode de 12 h, jusqu'à l'obtention de tiges.

Tableau 1 : Composition d'un litre de milieu de croissance pour la culture de l'igname

COMPOSÉS	POUR D. ALATA ET D. CAYENENSIS-ROTUNDATA	POUR D. TRIFIDA
Solution MacroMS 10X	100 mL	100 mL
Solution MicroMS 1000X	1 mL	1 mL
Solution FeEDTA 200X	5 mL	5 mL
Solution Vitamine de Morel 500X	2 mL	2 mL
Solution de Cystéine 200X	5 mL	/
Saccharose	30 g	30 g
BAP à 1 mg/mL	1 mL	0,1 mL
L-Glycine	/	100 mg
L-Glutamine	200 mg	200 mg
Agar	7 g	7 g
Charbon actif	2 g	2 g
Eau filtrée	qsp 1 L	qsp 1 L

Parmi la dizaine de tubes mis en chambre de culture, des pertes par contaminations peuvent survenir. L'objectif est d'obtenir au moins une plante développée constituée de racines et de feuilles en plus de la tige, à partir de laquelle un micro-bouturage pourra être effectué pour obtenir 12 tubes. La durée de ces deux étapes de croissance, avant et après le micro-bouturage, varie en fonction de l'aptitude de chaque plante à redémarrer sa croissance malgré le stress de la mise en culture. En général, la deuxième étape dure environ deux mois. Les 12 tubes sont ensuite placés dans la chambre de culture de la collection. À partir de cette étape, l'accession est considérée comme introduite dans la collection avec succès.

L'entretien de la collection en culture *in vitro*

L'entretien de la collection conservée en chambre de culture nécessite des repiquages réguliers (tous les 8 à 12 mois

en fonction des accessions), une surveillance de la santé des vitroplants (contaminations, épuisement du milieu de culture, plants trop développés ou au contraire ne se développant pas) et un contrôle des conditions de température, d'humidité et de luminosité.

Préparation du milieu de culture de croissance

Le milieu synthétique sur lequel sont cultivés les vitroplants permet de répondre de façon optimale à leurs besoins nutritifs. La composition de départ a été mise au point par des chercheurs tels que Mantell & Hugo (1989), et peut être adaptée à une espèce, voire à un cultivar.

Pour être plus précis, la méthode ci-dessous présente la manipulation avec préparation des solutions-mères de macroéléments MS, de microéléments MS et de FeEDTA (Murashige & Skoog, 1962), pour la préparation de 1 L de milieu de culture (Tableau 1). Une poudre de ce milieu prêt à l'emploi, qui contient aussi les vitamines de Morel (MO222), est également disponible dans le commerce (Khalys, Montpellier, France).

Pour réaliser le milieu de culture, tous les réactifs, sauf l'agar et le charbon actif, sont mélangés dans un bécher de 1 L, sur un agitateur magnétique. Le pH de la solution est amené entre 5,6-5,7 avec quelques gouttes de NaOH 1N, et le volume de la solution est ajusté à 1 L avec l'eau filtrée.

L'agar et le charbon actif sont ajoutés dans une bouteille de laboratoire de 2 L dans laquelle la solution préparée précédemment est versée. Le tout est stérilisé par autoclavage, à 121 °C pendant 20 min, avec les tubes à essai qui recueilleront le milieu.

Une fois l'autoclavage réalisé, le milieu de culture est distribué dans les tubes à essai à l'aide d'un distributeur de milieu à raison de 10 mL par tube, sous hotte à flux laminaire.

Micro-bouturage des plants

Le micro-bouturage consiste à découper les vitroplants en plusieurs boutures qui donneront chacune un nouveau plant génétiquement identique à la plante-mère (clone).

En général, les vitroplants à repiquer sont âgés de 8 à 12 mois, mais il peut également s'agir de plants présentant des signes de dépérissement ou d'accessions pour lesquelles moins de 6 vitroplants sont disponibles.

La vérification visuelle de l'état des vitroplants de chaque accession doit être faite régulièrement, à raison d'une fois par semaine.

Mode opératoire (Figure 3)

Pour les accessions dont le stock de vitroplants est infé-

rieur ou égal à 6, tous les vitroplants sont utilisés pour le micro-bouturage. Dans le cas contraire, on choisit jusqu'à 4 vitroplants parmi les plus vigoureux.

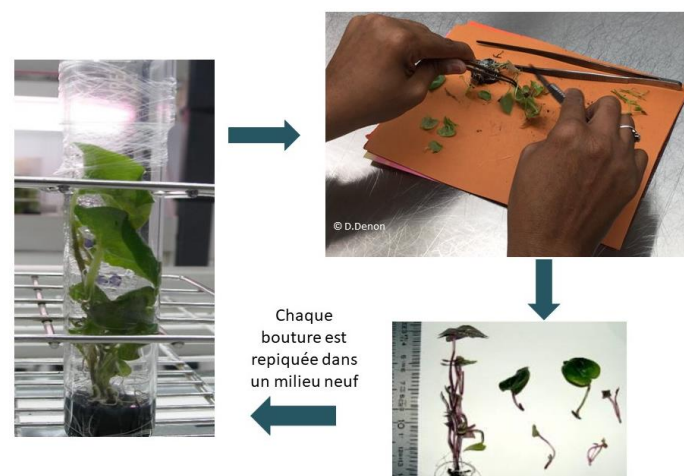


Figure 3. Conservation de vitroplants d'igname en culture *in vitro* : schéma représentant les étapes de la multiplication

La manipulation se fait sous la hotte à flux laminaire en conditions stériles.

Les vitroplants sont sortis de leur tube de culture et déposés sur une feuille cartonnée, afin de prélever un maximum de micro-boutures, l'objectif étant d'en obtenir au moins 12 par accession. À l'aide d'un scalpel, les nœuds comportant chacun un méristème sont découpés et placés dans un tube contenant du milieu de croissance neuf. Le méristème est un amas de cellules totipotentes, c'est-à-dire capables d'engendrer n'importe quel tissu végétal, à partir desquels une plante entière peut-être régénérée. Si les nœuds comportent de jeunes feuilles, celles-ci sont conservées. Les feuilles âgées ou abîmées sont retirées.

Pour finir, une étiquette comportant l'identifiant de l'accession est apposée sur chaque tube. Ces derniers sont ensuite placés dans une chambre de culture à 25 °C avec une photopériode de 12 h.

Un relevé des contaminations est effectué 2 jours après le repiquage, puis 10 jours après et, enfin, 20 jours après.

Si au bout de 2 mois les microboutures présentent un développement racinaire correct, le reste du lot initial de vitroplants est éliminé. Sinon, ce dernier est utilisé pour faire un nouveau micro-bouturage.

L'assainissement de la collection

L'indexation régulière et complète par outils moléculaires de la collection *in vitro* d'igname a révélé que 93 % des accessions contenaient un ou plusieurs virus. De plus, au fil des années, les outils de détection virale se sont améliorés et ont augmenté en sensibilité révélant non seulement de

nouvelles accessions infectées, mais aussi la présence de nouveaux virus encore non identifiés sur igname. En réponse à ce constat, le CRB a mis en place des techniques d'assainissement en culture *in vitro*, à savoir la thermothérapie couplée à la culture de méristème (Umber *et al.*, 2020). Elles sont complémentaires et permettent l'élimination partielle ou complète des virus infectant un vitroplant. La première consiste à faire pousser des explants d'igname dans une enceinte thermostatée à 34 °C, ce qui ralentit la réplication virale. La seconde vise à exciser les méristèmes apicaux, naturellement indemnes de nombreux virus, afin de régénérer un vitroplant sain.

Ces deux techniques doivent être effectuées successivement (Figure 4).

Thermothérapie et culture de méristème (Figure 4)

Thermothérapie

La première étape consiste à multiplier une série de 12 accessions issues de la collection *in vitro*. L'objectif est d'obtenir au moins 4 vitroplants par accessions, qui seront appelés « plantes mères ».

Après deux mois de croissance, ces vitroplants sont découpés en 20 boutures qui sont ensuite placées dans des boîtes vitrovent (Dutscher, Illkirsch, France) contenant le milieu de croissance. Chaque boîte contenant les 20 boutures d'une même accession est placée dans une enceinte thermique chauffée à 34 °C, avec une photopériode de 12h, pendant deux mois.

Culture de méristèmes

Au bout des deux mois, les boîtes sont retirées de l'enceinte thermique et le morceau de tige portant le méristème apical de chaque plante est découpé puis déposé dans une boîte de Pétri vide.

Le méristème étant très petit (moins de 1 mm), la suite des manipulations s'effectue sous loupe binoculaire pour retirer, à l'aide d'une pointe de scalpel, les tissus de la tige et le plus d'ébauches foliaires possible. Les tissus cellulaires autres que ceux des méristèmes ont, en effet, plus de risque d'être contaminés.

Les 20 méristèmes prélevés par accession sont ensuite déposés sur un milieu de régénération (Umber *et al.*, 2020), préparé dans des petites boîtes de Petri, pour permettre l'obtention d'une nouvelle plante. Les boîtes sont placées dans une chambre de culture à 25 °C et avec une photopériode de 16 h.

Si les boîtes ne sont pas contaminées, les 20 méristèmes prélevés permettront la régénération de 20 mériplants, c'est

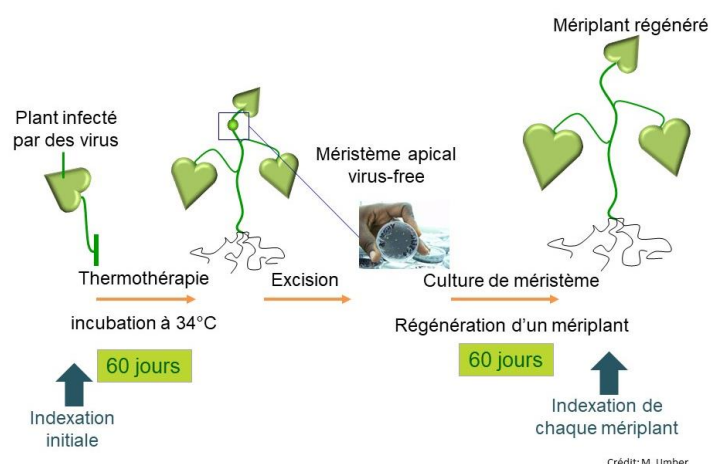


Figure 4. Étapes de l'assainissement d'une accession d'igname à partir d'un vitroplant

à dire des vitroplants issus de méristèmes, au minimum au bout d'un mois de culture. Les mériplants sont alors repiqués dans des tubes contenant du milieu de croissance. Une fois les mériplants suffisamment développés pour être prélevés et repiqués, ils sont indexés avec la plante-mère, à l'aide de tests de détection moléculaires, afin de vérifier l'élimination des virus.

Indexation virale

Aujourd'hui, 13 tests permettant la détection de virus à ARN et 1 test permettant la détection de virus à ADN ont été développés par le CRB (Tableau 2).

Tableau 2 : Liste des 14 virus ou groupe de virus ciblés par les tests de détection développés par le CRB Plantes Tropicales sur igname

GÉNOME	FAMILLE	GENRE	VIRUS CIBLÉS
Virus à ARN	Alphaflexiviridae	Potexvirus	potexvirus d'igname
			yam virus X (YVX)
	Betaflexiviridae	non assigné	tout le genre
			yam virus Y (YVY)
	Bromoviridae	Cucumovirus	cucumber mosaic virus (CMV)
	Closteroviridae	Ampelovirus	air potato virus 1 (AiPoV1)
			yam asymptomatic virus 1 (YaV1)
		Velarivirus	Cordylone virus 1 (CoV1)
	Potyviridae	Macluravirus	macluravirus d'igname
			tout le genre
Potyvirus		yam mosaic virus (YMV)	
Secoviridae	Sadwavirus	yam mild mosaic virus (YMMV)	
		Dioscorea mosaic associated virus (DMaV)	
Virus à ADN	Caulimoviridae	Badnavirus	tout le genre

Étapes spécifiques à la détection des virus à ARN

(Umber *et al.*, 2020 ; Figure 5)

Pour détecter des virus à ARN, la première étape consiste à extraire, par broyage et élimination des autres composants de la plante, la totalité du matériel génétique, aussi bien celui de la plante que celui des virus. Cette technique est appelée extraction de TNA (acides nucléiques totaux : ADN + ARN).

Les virus à ARN sont ensuite détectés par RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymérase Chain Reaction). L'ARN ne pouvant pas être amplifié directement par PCR, les génomes viraux sont d'abord transformés en ADN complémentaires (ADNc) par une enzyme rétrotranscriptase. Ensuite, l'amplification des génomes de chacun des virus est réalisée par PCR, à l'aide d'amorces génériques et/ou spécifiques, afin d'obtenir en grande quantité les séquences virales ciblées.

Étapes spécifiques à la détection des virus à ADN

(Umber *et al.*, 2017 ; Figure 6)

La particularité de la détection des virus à ADN du genre Badnavirus réside dans le fait que ces virus peuvent être présents sous deux formes chez l'igname : les particules virales libres dans les cellules de la plante et les séquences virales intégrées dans le génome de la plante. La forme que nous voulons détecter ici, car potentiellement infectieuse, est celle des particules virales. Afin de ne pas obtenir des faux positifs dus à la présence de séquences virales insérées dans le génome de la plante, les particules virales ciblées vont être piégées par des anticorps qui fixent les protéines de la capsid virale. Cette étape est appelée immunocapture. Le matériel génétique de la plante est ensuite éliminé par un traitement spécifique qui ne détruit pas celui des particules virales, lequel est protégé par la capsid.

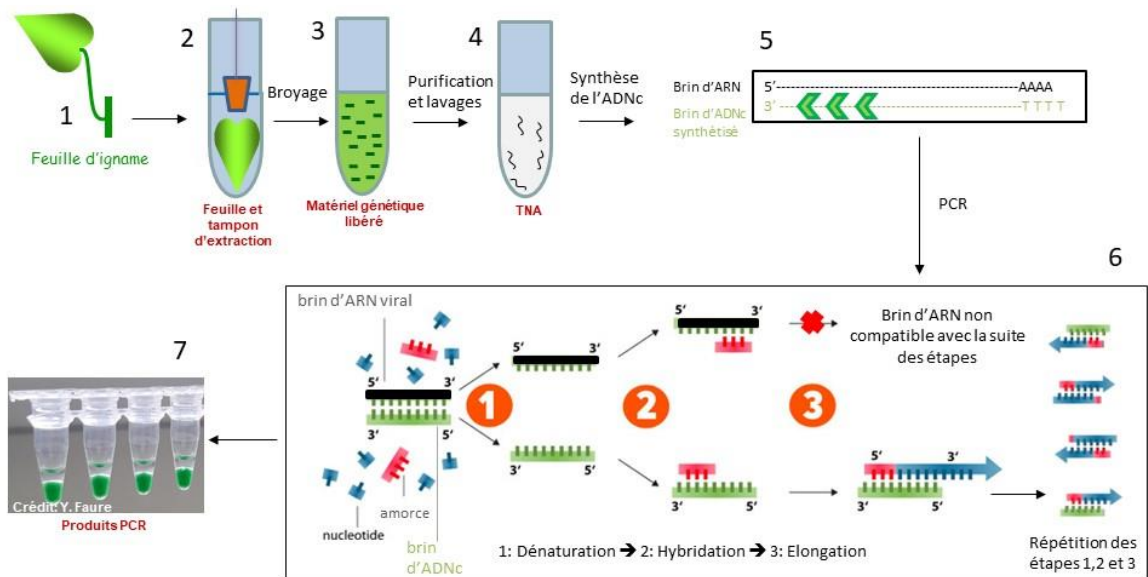


Figure 5. Étapes de détection des virus à ARN par RT-PCR

Crédit: R.-M. Gomez et Y. Faure

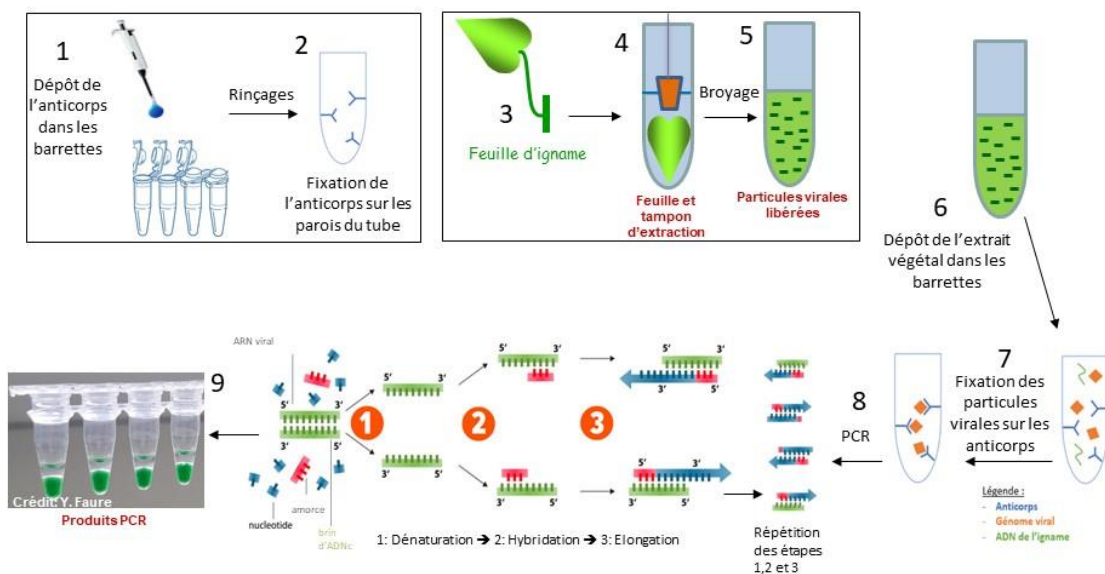


Figure 6. Étapes de détection des virus à ADN par IC-PCR

Crédit: R.-M. Gomez et Y. Faure

Une PCR classique est ensuite effectuée afin d'obtenir, en grande quantité, les séquences virales ciblées.

Étapes communes

Pour finir, les séquences d'ADN générées par la PCR, et appelées produits PCR, sont déposées sur un gel d'agarose et révélées sur une table à UV, après application d'un courant. En effet, l'ADN est chargé négativement et migre donc vers le pôle positif à une vitesse qui dépend de la taille des produits PCR. Plus les produits PCR sont petits et plus ils migrent vite. Leur taille est estimée grâce au marqueur de taille (Figure 7), ce qui permet l'identification des virus.

La Figure 7.A montre les résultats d'une migration sur gel d'agarose après une PCR de détection de YMV sur 3 méridants d'une même accession après assainissement. L'absence de signal pour le méridant 1 montre qu'il est assaini pour ce virus.

De la même façon, en Figure 7.B, la révélation de la PCR de détection des badnavirus sur une autre accession montre que le méridant 2 est assaini pour les badnavirus

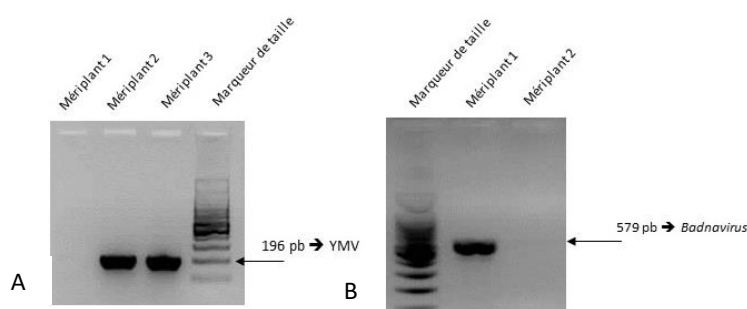


Figure 7. Exemples de photos de gel après migration de différents produits PCR

Conclusion

La conservation *in vitro* est effectivement moins contraignante que la conservation au champ (espace plus réduit et entretien moins chronophage). Cependant, les moyens humains, financiers et structurels imposent des limites quant au nombre d'accessions conservées. Connaître la variabilité génétique au sein des différentes espèces est un de nos objectifs pour les années à venir. Ces informations nous permettraient d'orienter nos choix si nous devions réduire le nombre d'accessions conservées ou encore lors de l'introduction de nouvelles variétés et la fourniture de matériel aux bénéficiaires de la collection.

Aujourd'hui, le statut viral de 396 accessions en culture *in vitro* est connu pour 8 virus, et 16 accessions ont été assainies avec succès pour ces mêmes virus (CMV, DMaV, YaV1, YMV, YMMV et les genres Badnavirus, Macluravirus et Potexvirus).

La technique d'assainissement combinant la thermothérapie et la culture de méristème est une méthode longue et compliquée à gérer avec un taux de réussite variable. En effet, elle a une efficacité de 100 % pour l'élimination des macluravirus, retrouvés principalement sur *D. alata* avec 14,5 % de prévalence dans la collection (Umber *et al.*, 2020). En revanche, le taux d'assainissement de YaV1 et de YMMV est très faible (14,5 % et 24,9 %, respectivement), alors que la prévalence de ces virus est très élevée dans la collection (par exemple 82,1 % sur *D. alata* pour YaV1 et 72,1 % sur *D. trifida* pour YMMV). Or, il est conseillé et parfois imposé, surtout à l'international, que le matériel fourni par le CRB soit exempt de virus. Ces observations montrent le besoin de développer des techniques potentiellement plus efficaces sur igname, comme par exemple la cryothérapie qui utilise le traitement à l'azote liquide sur des méristèmes pour éliminer les virus.

À l'échelle du laboratoire, la découverte régulière de nouveaux virus complique l'établissement du statut viral des accessions ainsi que leur assainissement. Mais à l'échelle internationale, ce sont les échanges de matériel biologique qui sont impactés. ■

Remerciements

Nous tenons à remercier Marie UMBER et Michel ROUX-CUVELIER pour leur relecture attentive.

Références

Agreste Guadeloupe, 2020. Mémento de la statistique agricole. Disponible en ligne :

https://daaf.guadeloupe.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/memento_2020_internet_cle4814fe.pdf

Arnolin R., 1988. VII' Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, Gosier (Guadeloupe), 1-6 July 1985, Ed. INRA, Paris, 1988.

Arnolin R., Gamiette F. et Degras L., 1989. L'obtention de plantules d'igname (*D. alata* et *D. cayenensis-rotundata*) par culture d'embryons *in vitro*. Caribbean Food Crops Society > 25th Annual Meeting, July 1-6, 1989, Gosier, Guadeloupe. <https://ageconsearch.umn.edu/record/260002/>

Barlagne C., Cornet D., Blazy J.M., Diman J.L. and Ozier-Lafontaine H. Consumers' preferences for fresh yam: A focus group study. Food Sci. Nutr. 2017, 5, 54-66. <https://doi.org/10.1002/fsn3.364>.

Degras L., 1986. L'igname. France : G.-P. MAISONNEUVE ET LAROSE A.C.C.T.

FAOSTAT. Disponible en ligne : <http://www.fao.org/faostat/> (19.07.2021).

Lacointe A. et Zinsou C., 1987. Effet de la date de plantation sur la croissance et le développement de plantules d'igname (*Dioscorea alata* L.) produites par culture *in vitro*. Agronomie, EDP Sciences, 1987, 7 (7), pp.475-481. <https://hal.inrae.fr/hal-02722349v1>.

Mantell S. H. & Hugo S. A., 1989. Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. Plant cell, tissue and organ culture, 16(1):23-37.

Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Plant Physiology, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

UMBER M., GOMEZ R.-M., GÉLABALE S., BONHEUR L., PAVIS C. and TEYCHENEY P.-Y., 2017. The genome sequence of *Dioscorea* bacilliform TR virus, a member of the genus *Badnavirus* infecting *Dioscorea* spp., sheds light on the possible function of endogenous *Dioscorea* bacilliform viruses. Archives of Virology, 2017, 162 (2), pp.517-521. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3113-3>.

UMBER M., FILLoux D., GÉLABALE S., GOMEZ R.-M., MARAIS A., GALLET S., GAMINETTE F., PAVIS C. and TEYCHENEY P.-Y. Molecular Viral Diagnosis and Sanitation of Yam Genetic Resources: Implications for Safe Yam Germplasm Exchange. Viruses 2020, 12, 1101. <https://doi.org/10.3390/v12101101>.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Évaluer l'effet du temps et de la méthode de conservation du matériel végétal sur la quantité et la qualité de l'ADN extrait

Matthieu LINGRAND¹
Caroline SCOTTI-SAINTAGNE¹
Sylvie ODDOU-MURATORIO¹
Marianne CORREARD²
Olivier GILG²
Franck REÏ²
Anne ROIG¹
Patrice BRAHIC³

CORRESPONDANCE

matthieu.lingrand@inrae.fr

RÉSUMÉ

L'URFM stocke plus de 40 000 échantillons végétaux soit à -20 °C soit à température ambiante après déshydratation. Le projet présenté dans cet article avait pour but d'évaluer la quantité et la qualité de l'ADN obtenu à partir d'échantillons de quatre espèces d'arbres méditerranéens faisant l'objet de recherches récurrentes à l'URFM : trois conifères (le pin de Salzman, le sapin pectiné et le cèdre de l'Atlas) et un feuillu (le hêtre commun). L'hypothèse retenue est que la durée de conservation a un effet sur la qualité du matériel génétique ; nous n'avons aucun a priori sur l'effet de la méthode de conservation. Pour mesurer la qualité de l'ADN, nous avons effectué des analyses de génotypage et de séquençage couramment utilisées au laboratoire. Nos résultats montrent une variation entre les quatre espèces étudiées, en fonction du mode et de la durée de conservation, sur la quantité et la qualité de l'ADN. De plus, nous avons montré que les échantillons conservés sur la plus longue période ou avec la méthode la plus basique (à sec) présentent une bonne qualité d'ADN contrairement à des échantillons plus récents.

MOTS-CLÉS

Biologie moléculaire, échantillons végétaux, qualité ADN, stockage.

1 INRAE, UR629 Écologie des Forêts Méditerranéennes (URFM), Domaine Saint Paul, Site Agroparc, FR-84914 Avignon Cedex 9, France.

2 INRAE, UE0348 Unité Expérimentale Entomologie et Forêt Méditerranéenne. INRA-UEFM Domaine Saint Paul, Site Agroparc 84914 Avignon, France.

3 Office National des Forêts, Pôle National des Ressources Génétiques Forestières, Route du barrage 13115 Saint Paul Lez Durance, France.

Assessing the effect of time and conservation method of plant material on the quantity and quality of extracted DNA

Matthieu LINGRAND¹
Caroline SCOTTI-SAINTAGNE¹
Sylvie ODDOU-MURATORIO¹
Marianne CORREARD²
Olivier GILG²
Franck REÏ²
Anne ROIG¹
Patrice BRAHIC³

CORRESPONDENCE

matthieu.lingrand@inrae.fr

ABSTRACT

URFM stores more than 40,000 plant samples either at -20°C or at room temperature after dehydration. The aim of the project presented in this article was to assess the quantity and quality of DNA obtained from samples of four Mediterranean tree species. To evaluate DNA quality, we performed genotyping and sequencing analyses commonly used in the laboratory. Our results showed a variation among species in the quantity and the quality of DNA as a function of the method and duration of sample conservation. In addition, samples kept over the longest period or with the most basic (dry) method were not those with the poorest DNA quality

KEYWORDS

Molecular biology, plant samples, DNA quality, storage.

1 INRAE, UR629 Écologie des Forêts Méditerranéennes (URFM), Domaine Saint Paul, Site Agroparc, FR-84914 Avignon Cedex 9, France.

2 INRAE, UE0348 Unité Expérimentale Entomologie et Forêt Méditerranéenne. INRA-UEFM Domaine Saint Paul, Site Agroparc 84914 Avignon, France.

3 Office National des Forêts, Pôle National des Ressources Génétiques Forestières, Route du barrage 13115 Saint Paul Lez Durance, France.

Introduction

Les établissements de recherche se sont engagés dans une nouvelle organisation de leurs infrastructures de recherche pour en faire des lieux de production et de collecte des données mieux partagés entre les équipes d'un même organisme et avec ses partenaires (chantiers #OpenScience et #OpenData). Beaucoup d'efforts sont ainsi consacrés à INRAE et dans d'autres établissements de recherche pour archiver, traiter et partager les données expérimentales acquises au cours des programmes de recherche. En amont des données proprement dites, se pose la question de la conservation et du suivi de la qualité des échantillons de matériel végétal ou animal qui ont permis d'acquérir ces données.

Le cas de la conservation des échantillons végétaux à l'URFM (Unité de Recherche en écologie des Forêts Méditerranéennes) illustre bien cette problématique. Dans le cadre de ses recherches sur la dynamique des écosystèmes forestiers méditerranéens, l'URFM et son partenaire l'UEFM (Unité expérimentale Entomologie et Forêt Méditerranéenne) ont mis en place un dispositif de conservation des échantillons végétaux, constitués de feuilles et de graines. Ce dispositif recouvre la gestion physique et le suivi des échantillons dans les enceintes de stockage, mais aussi leur intégration dans une base de données (BDD), créée en interne (par C. Pichot), afin de tracer l'origine du matériel récolté, le localiser dans les enceintes et gérer les quantités de matériel restantes au fil du temps. Cette BDD compte actuellement plus de 40 000 échantillons. Ces échantillons ont été collectés dans des peuplements divers, parfois éloignés du laboratoire, et sur des arbres qui ont pu mourir depuis la collecte du matériel, ce qui les rend d'autant plus précieux. Beaucoup de ces échantillons ont été utilisés pour générer des données (par génotypage et séquençage) dans le cadre de projets scientifiques de biologie et génétique des populations, mais une partie n'a encore jamais fait l'objet d'analyses. L'objectif de la conservation de ces échantillons est de disposer facilement de matériel pour de futures analyses (par exemple, avec de nouvelles techniques de biologie moléculaire), dans le cadre de projets de l'URFM ou en partenariat. Néanmoins, cela nécessite de s'assurer de la bonne qualité de la conservation du matériel. En outre, la multiplication du nombre d'échantillons stockés nous contraint à faire des choix en matière de mode de conservation. Initialement, deux modes de conservation étaient utilisés : (1) une enceinte de stockage à -20 °C et (2) un congélateur à -80 °C. En 2012, un troisième mode de stockage a commencé à être utilisé, le stockage d'échantillons

« secs » après leur déshydratation à l'étuve.

La qualité de l'ADN nécessaire pour les analyses de biologie moléculaire reste en effet largement méconnue (méthode de dosage, présence d'inhibiteurs, taille des fragments), ainsi que l'effet du mode et de la durée de conservation de l'échantillon végétal. Il serait en particulier souhaitable de déterminer une « date de péremption » pour les échantillons que nous conservons.

De façon générale, nous avons deux hypothèses. La première considérait que la conservation du matériel à -20 °C devrait permettre d'avoir une meilleure qualité et quantité d'ADN que la conservation à sec. Toutefois, les aléas associés aux enceintes froides (problèmes de décongélation partielle des échantillons lors de pannes ou de leur manipulation) pourraient réduire cette qualité/quantité d'ADN. La deuxième hypothèse était que la qualité et quantité d'ADN diminuent avec la durée de conservation.

L'objectif du projet présenté ici, pour lequel nous avons demandé l'appui du département EFPA (Écologie des Forêts, Prairies et milieux Aquatiques), est d'étudier **l'impact du mode et de la durée de conservation du matériel végétal sur la quantité et la qualité de l'ADN utilisé pour des projets scientifiques mettant en œuvre des techniques de biologie moléculaire.**

Pour atteindre cet objectif, nous avons mesuré l'effet du mode et de la durée de conservation des échantillons végétaux sur la qualité et la quantité de l'ADN extrait à partir d'un lot de 48 échantillons choisis parmi les 40 000 stockés. La qualité et la quantité d'ADN ont été évaluées par différentes approches utilisées en routine au laboratoire et systématiquement comparées entre échantillons conservés et témoins « frais » récoltés sur le terrain juste avant les analyses.

Matériels et méthodes

Afin de limiter les coûts du projet liés à la récolte des échantillons témoins, les individus sélectionnés pour les analyses ont été choisis en fonction de leur situation géographique (à proximité de l'URFM et sur des sites régulièrement visités). Les analyses en laboratoire ont été effectuées au sein du LBM (Laboratoire de Biologie Moléculaire), plateforme régionale qui accueille différentes unités du centre de recherche d'Avignon.

Par ailleurs, nous avons optimisé l'analyse en tenant compte des contraintes techniques du laboratoire. Par exemple, le séquenceur utilisé étant limité à 48 échantillons par passage, nous nous sommes basés sur ce nombre pour définir le plan d'expérience du projet (Annexe 1). Enfin,

nous avons dupliqué cette plaque pour tester la reproductibilité de nos résultats.

Sélection des échantillons conservés et de leur témoin positif

Nous avons sélectionné les échantillons pour cette étude en interrogeant la BDD. Les critères de sélection ont été : la situation géographique des arbres d'origine des prélèvements, la durée de conservation des échantillons et la méthode de stockage des échantillons. Enfin, nous nous sommes concentrés sur quatre espèces d'arbres forestiers faisant l'objet de recherches récurrentes à l'URFM : trois conifères (le pin de Salzman, le sapin pectiné et le cèdre de l'Atlas) et un feuillu (le hêtre commun). En intégrant ces différentes contraintes, nous avons analysé un total de 23 échantillons de cèdre (correspondant à 13 individus, 3 durées de conservation et 2 méthodes de stockage), 23 échantillons de sapin (correspondant à 5 individus, 3 durées de conservation et 2 méthodes de stockage), 24 échantillons de hêtre (correspondant à 14 individus, 4 durées de conservation et 2 méthodes de stockage), 24 échantillons de pin de Salzman (correspondant à 18 individus, 5 durées de conservation et 1 méthode de stockage) et, enfin, 2 échantillons négatifs. Les échantillons négatifs correspondent à deux puits vides en pré-extraction qui vont suivre l'ensemble du processus et sont utilisés pour mettre en évidence une potentielle contamination (Annexe 1).

Pour chaque espèce, entre 5 et 8 échantillons témoins positifs ont été pré-sélectionnés au laboratoire. Pour chaque échantillon témoin, un arbre remplaçant a également été choisi pour prévenir les éventuels aléas de la récolte (arbre mort ou difficile à retrouver sur le terrain). Ces témoins positifs (« échantillons frais ») ont été prélevés sur trois sites (le Ventoux pour le sapin et le hêtre, la plantation comparative du Treps pour le cèdre et la pépinière de Cadarache pour le pin de Salzman).

Récolte et mise en plaque

La semaine précédant la récolte des témoins positifs, les échantillons conservés et enregistrés en BDD ont été extraits des enceintes climatiques et mis en plaque. Deux plaques identiques ont été préparées et stockées à -20 °C.

La semaine de la récolte, les prélèvements de feuilles et d'aiguilles ont été réalisés en double, sur trois jours (un jour/site), les échantillons ont été transportés à -170 °C à l'aide de matériel adapté. Les témoins positifs ont été conservés ainsi jusqu'à la mise en plaque.

Analyses au laboratoire

Notre objectif était d'évaluer la qualité des échantillons à l'aide d'analyses classiques, réalisées en routine dans le cadre des projets de biologie moléculaire, couramment mises en œuvre à l'URFM. Toutes ces analyses ont été systématiquement effectuées sur les deux plaques répliquées, sauf le séquençage qui n'a été effectué que sur l'une des deux plaques.

L'ADN des échantillons de feuilles et d'aiguilles a été extrait à l'aide du DNeasy 96 plant kit (Qiagen), puis conservé sous forme aliquotée dans plusieurs plaques.

Un dépôt sur gel d'agarose à 1 % a tout d'abord été réalisé afin d'apprécier visuellement la qualité globale de l'ADN et de mettre en évidence d'éventuelles dégradations avec la présence de « smears » (trainées). Les résultats du gel ont été notés sous forme d'une variable à trois catégories : a) présence d'une bande nette (bonne qualité d'ADN) ; b) présence d'une bande dégradée (qualité moyenne) ; c) absence de bande (absence ou faible quantité d'ADN).

La quantité d'ADN a été ensuite évaluée par un dosage au NanoDrop™ (Thermo Scientific). Avec cette approche, la mesure des absorbances du spectre permet de quantifier et d'analyser la pureté des acides nucléiques. Nous avons aussi dosé l'ADN avec la méthode PicoGreen™ (Invitrogen), basée sur l'utilisation d'un colorant fluorescent spécifique de l'ADN double-brin et considérée comme plus précise que la technique au NanoDrop™.

Deux analyses classiques de biologie moléculaire ont enfin été réalisées : (a) l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) multiplex de marqueurs microsatellites spécifiques de chacune des espèces, (b) le séquençage à partir d'amorces trnH-psbA qui ciblent l'ADN chloroplastique, utilisées couramment dans le cadre de projets de code-barres moléculaires ou Barcoding (Annexe 2).

Analyses statistiques

Une analyse de variance de type II a été réalisée pour tester la significativité des principaux effets qui affectent la qualité et la quantité de l'ADN. La masse de matériel pesée au départ a été incluse dans le modèle en co-facteur ainsi que l'effet plaque (analyse répétée sur les deux plaques).

Résultats

Qualité de l'ADN visualisée sur gel d'agarose

Le dépôt sur gel d'agarose a montré une importante variabilité de la qualité de l'ADN entre espèces (Figure 1). Des bandes nettes ont été obtenues pour plus de 70 % des échantillons

de sapin et de pin et pour plus de 50 % des échantillons de cèdre (Tableau 1). En revanche, aucun des 24 échantillons de hêtre du projet ne présentait de bande nette. Des variations ont également été observées pour les témoins positifs avec 57 % de bandes nettes pour le cèdre, 80 % pour le sapin, 100 % pour le pin et aucune bande nette pour le hêtre, alors qu'on aurait pu s'attendre à 100 % de bandes nettes avec ce matériel frais. L'état du matériel récolté (phase du cycle de l'arbre en fonction de la saison) et les aléas liés au transport et au stockage de matériel frais expliquent probablement les proportions obtenues plus faibles que celles attendues.

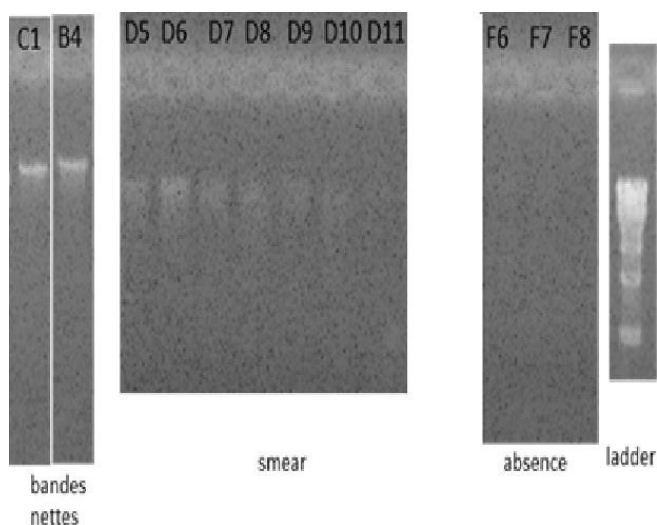


Figure 1. Exemple de visualisation de la qualité de l'ADN sur gel agarose 1 % en tampon d'électrophorèse TAE 1X.

Ce gel montre différents dépôts de 5µl ADN + 2µl tampon de charge + 5µl d'eau avec une échelle de poids moléculaire avec 2µl de 100bp DNA Ladder (PROMEGA). L'indication au-dessus des puits correspond à la position des échantillons sur la plaque.

Tableau 1 : Pourcentage de bandes nettes observées pour chaque espèce selon le mode de conservation

ESPÈCE	Pourcentage			
	TOTAL (TÉMOINS POSITIFS INCLUS)	POUR LES TÉMOINS POSITIFS	POUR LES ÉCHANTILLONS STOCKÉS À -20 °C	POUR LES ÉCHANTILLONS STOCKÉS À SEC
CÈDRE	57	57	58	50
HÊTRE	0	0	0	0
PIN	71	100	61	NA*
SAPIN	74	80	80	33

* NA. non analysable par absence de matériel de ce type

L'ANOVA a permis de mesurer quantitativement l'effet de la méthode de conservation sur la qualité de l'ADN, évaluée par la présence de bandes nettes sur gel d'agarose. Pour toutes les espèces, le témoin (frais de l'année) donne toujours une proportion égale ou supérieure (Tableau 1) de bandes nettes. Pour le cèdre et le hêtre, la méthode de conservation (-20 °C ou à sec) ne joue pas sur la proportion de bandes nettes. En revanche, pour le sapin, le matériel sec est déconseillé pour avoir une bande nette sur agarose.

Concernant l'effet de la durée de conservation, nos résultats suggèrent une diminution de la qualité de l'ADN pour les échantillons conservés à -20 °C avec l'augmentation de la durée de conservation pour le pin (hors année 2011) et le sapin. Les six témoins positifs de pin testés présentent une bande nette, les échantillons de pin de 2012 et de sapin de 2011 et 2012 présentent 100 % de bandes nettes et le pourcentage descend à 33 % pour les échantillons de pin de 2008 et à 50 % pour les sapins de 2007 (Tableau 2).

Tableau 2 : Pourcentage de bandes nettes observées pour chaque espèce en fonction du temps de conservation pour les échantillons stockés à -20 °C

Pourcentage de bandes nettes								
	CÈDRE		PIN		SAPIN		HÊTRE	
TÉMOINS POSITIFS	57		100		80		0	
ÉCHANTILLONS STOCKÉS À -20 °C	Année	%	Année	%	Année	%	Année	%
	2001	71	2008	33	2007	50	2004	0
	2008	40	2009	67	2011	100	2008	0
			2010	67	2012	100		
			2011	50				
			2012	100				
	58		61		80		0	

Si la qualité de l'ADN est jugée satisfaisante dès lors qu'une bande, nette ou dégradée, est observée, la proportion d'échantillons de qualité correcte augmente (Tableau 3). Cela est particulièrement visible pour les échantillons conservés à -20 °C. Les résultats changent notablement pour le

Tableau 3 : Pourcentage de bandes nettes ou dégradées observées pour chaque espèce selon le mode de conservation

Pourcentage de bandes nettes ou dégradées				
ESPÈCE	TOTAL (TÉMOINS POSITIFS INCLUS)	POUR LES TÉMOINS POSITIFS	POUR LES ÉCHANTILLONS STOCKÉS À -20 °C	POUR LES ÉCHANTILLONS STOCKÉS À SEC
CÈDRE	74	57	100	50
HÊTRE	63	87	50	50
PIN	92	100	89	NA*
SAPIN	83	80	87	33

* NA : non analysable par absence de matériel de ce type

hêtre, pour lequel plus de 60 % des échantillons présentent une bande dégradée. Deux groupes se distinguent : (1) les témoins positifs et les échantillons conservés à -20 °C qui ont une qualité satisfaisante avec un pourcentage égal ou supérieur à 50 %, (2) la condition « à sec » avec un pourcentage inférieur ou égal à 50 %. Avec ce critère de qualité, les résultats sur le hêtre rejoignent ceux obtenus sur les autres espèces. De plus, il est également observé pour le hêtre une meilleure qualité des ADN pour les échantillons récents par rapport aux échantillons plus anciens (Tableau 4). Contrairement aux attendus pour le cèdre, nous obtenons le résultat inverse, à savoir 57 % de qualité satisfaisante pour les témoins positifs, 80 % de qualité satisfaisante pour les échantillons prélevés en 2008 et, enfin, 100 % de qualité satisfaisante pour les échantillons récoltés en 2001 (Tableau 4). Les hypothèses pour expliquer les données obtenues chez le cèdre, mais que nous n'avons pas été en capacité de vérifier, peuvent être en lien avec la période de l'année à laquelle a été réalisé le prélèvement (ce qui peut affecter la qualité de l'ADN extrait) ou à une défaillance technique du congélateur contenant les échantillons.

Quantité d'ADN évaluée par dosage

Tableau 4 : Pourcentage de bandes nettes et dégradées observées pour chaque espèce en fonction du temps de conservation pour les échantillons stockés à -20 °C

Pourcentage de bandes nettes								
	CÈDRE		PIN		SAPIN		HÊTRE	
TÉMOINS POSITIFS	57		100		80		0	
ÉCHANTILLONS STOCKÉS À -20 °C	Année	%	Année	%	Année	%	Année	%
	2001	100	2008	66	2007	75	2004	20
	2008	80	2009	67	2011	100	2008	100
			2010	100	2012	100		
			2011	100				
		2012	100					
	58		89		87		50	

Avec la méthode NanoDrop™, les mesures montrent une grande variabilité de la concentration en ADN pour les échantillons, qui peut aller de 1 à 120 ng/μl par exemple pour le pin (Figure 2). Les concentrations moyennes d'ADN par espèces obtenues avec le dosage au PicoGreen™ et le NanoDrop™ sont en général proches (Tableau 5). Le pin est l'espèce pour laquelle nous obtenons le meilleur rendement, suivi par le sapin, le hêtre et enfin le cèdre. Il est également à noter que la différence des moyennes des concentrations en ADN entre les deux plaques répétées est faible (de l'ordre de 0.5 ng/μl).

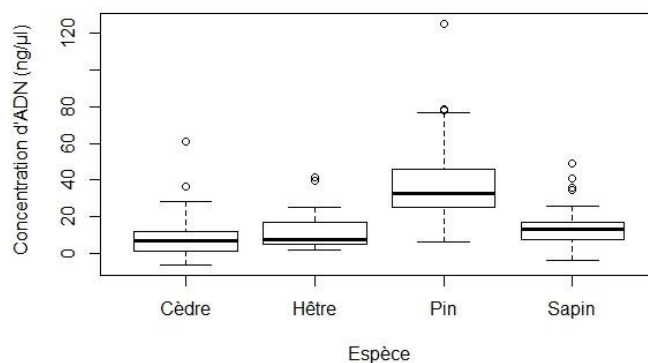


Figure 2. Quantité d'ADN (mesure avec le NanoDrop™) pour l'ensemble des échantillons d'une espèce donnée.

Tableau 5 : Comparaison de la quantité moyenne d'ADN obtenue pour les différentes espèces et avec 2 méthodes de dosage

ESPÈCE	Concentration moyenne d'ADN (en ng/μl)			
	PIN	SAPIN	HÊTRE	CÈDRE
DOSAGE NANODROPTM	57.41	21.16	12.06	3.79
DOSAGE PICOGREEN™	60	24.90	9.96	12.2

Les boîtes représentent l'intervalle interquartile (Q1 et Q3) et la ligne épaisse la médiane. Les extrémités des « moustaches » sont calculées en utilisant 1.5 x l'espace interquartile (la distance entre Q1 et Q3).

Pour les quatre espèces, l'effet de la méthode de conservation sur la concentration d'ADN mesurée avec le NanoDrop™ est significatif (Figure 3). Pour le cèdre, le matériel sec donne la meilleure concentration en ADN, alors que le meilleur mode de conservation pour le hêtre est le stockage à -20 °C, et le matériel frais pour le pin et le sapin. La concentration en ADN n'est pas significativement plus élevée pour le hêtre et le cèdre lorsque du matériel frais est utilisé, contrairement au pin et au sapin. De plus, comme les échantillons conservés à -20 °C sont situés dans

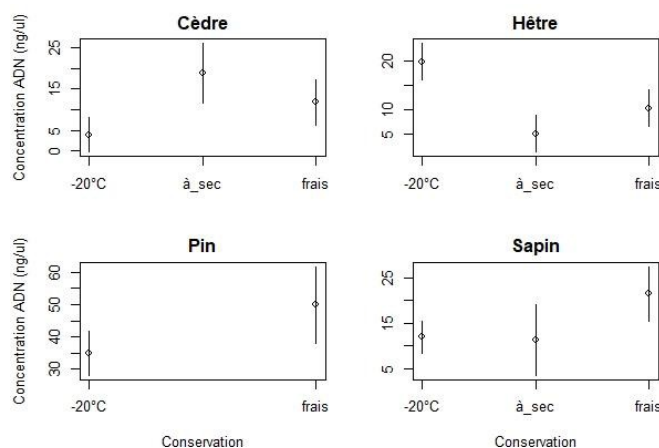


Figure 3. Concentration d'ADN obtenue en fonction de la méthode de conservation et de l'espèce. Ce graphique montre les prédictions basées sur l'ANOVA.

différentes enceintes (chambre froide ou congélateurs), nous avons pu analyser l'effet enceinte au sein de la modalité « -20 °C » (pour une année donnée et seulement chez le cèdre et le sapin). Les résultats ne montrent pas d'effet significatif de l'enceinte (données non fournies).

Pour les quatre espèces, un effet significatif de l'année de récolte est observé sur la concentration en ADN (Figure 4). On s'attendait à ce que les concentrations d'ADN les plus élevées soient mesurées pour les échantillons récoltés les plus récemment. Cette tendance semble globalement valable pour le cèdre, le pin et le sapin (avec des exceptions), mais moins pour le hêtre. Là encore, l'état du matériel au moment de la récolte (phase du cycle de l'arbre en fonction de la saison) joue probablement un rôle sur la concentration d'ADN.

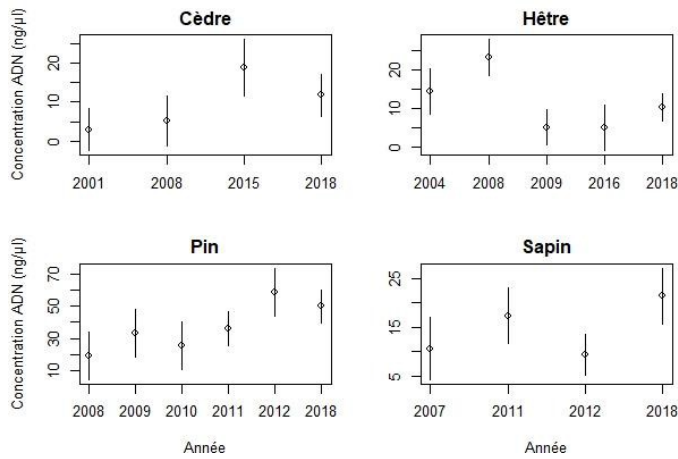


Figure 4. Concentration d'ADN obtenue en fonction de la durée de conservation et de l'espèce. Ce graphique montre les prédictions basées sur l'ANOVA.

Amplification de marqueurs microsatellites et séquençage

Nous n'avons pas détecté d'effet significatif du mode ou de la durée de conservation sur la hauteur des pics des microsatellites (Figure 5).

La qualité de la séquence d'ADN (la longueur maximale de séquence lue) est significativement moins bonne chez le cèdre lorsque le matériel de départ est sec (Figure 6). Pour les autres espèces, nous ne détectons pas d'effet significatif.

Conclusion

Comme nous nous y attendions, cette étude montre que la qualité et la quantité d'ADN obtenue sont affectées par la durée et le mode de conservation des échantillons

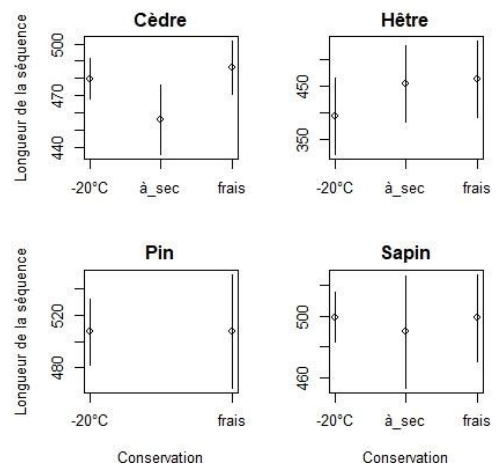


Figure 6. Longueur en bases de la séquence d'ADN lue en fonction de la méthode de conservation. Ce graphique montre les prédictions basées sur l'ANOVA.

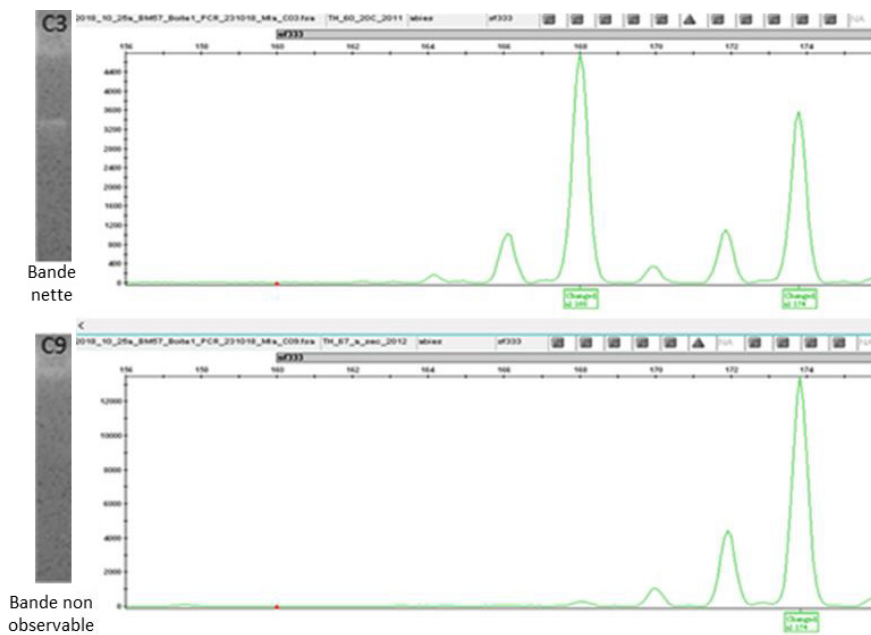


Figure 5. Comparaison de la migration sur gel d'agarose 1% et de la hauteur des pics de microsatellites pour deux échantillons de pin.

végétaux. Contrairement à ce que nous avons envisagé, ce ne sont pas forcément les échantillons frais qui donnent les meilleurs résultats. Il s'avère que le mode de conservation optimal dépend de l'espèce étudiée.

En ce qui concerne le mode de conservation, les plus fortes concentrations d'ADN sont obtenues avec le stockage à sec pour le cèdre, avec la conservation à -20 °C chez le hêtre et avec le matériel frais chez le sapin et le pin. Par contre, le mode de conservation maximisant la concentration d'ADN chez le cèdre est aussi associé à une moindre qualité des séquences obtenues (longueur de séquence lue diminuée). Nos résultats montrent également que, pour toutes les espèces étudiées, l'amplification des microsatellites n'est pas affectée par le mode ou la durée de conservation des échantillons.

En ce qui concerne la durée de conservation, ce ne sont pas toujours les échantillons les plus récents qui présentent la meilleure concentration ou qualité d'ADN, comme cela a été observé chez le hêtre et le cèdre. L'état du matériel au moment de la récolte doit aussi probablement avoir un effet.

Ce travail a d'ores et déjà permis de tirer un certain nombre d'enseignements pour la conservation des échantillons à l'URFM. Pour un usage courant, le mode de conservation à sec sera privilégié, car il ne donne pas de résultats significativement moins bons en termes de qualité et de quantité d'ADN, en revanche il présente l'avantage d'être moins coûteux et plus facile à mettre en œuvre.

Perspectives

Le projet présenté ici a permis d'étudier l'effet du mode et de la durée de conservation des échantillons végétaux sur la qualité de l'ADN extrait, lors de la mise en œuvre de techniques d'analyses de biologie moléculaire utilisées en

routine (amplification de microsatellites ou séquençage avec des amorces pour le barcoding). Il serait toutefois intéressant d'évaluer la qualité de l'ADN à travers d'autres techniques (géotypage SNP, séquençage d'ADN nucléaire, par exemple). Il serait également utile de poursuivre ce projet dans la durée et d'effectuer un nouveau test qualité, dans des conditions similaires, avec une partie au moins des échantillons analysés. Cela permettrait d'affiner l'étude de l'effet de la durée de conservation et, peut-être, de fixer une durée maximale de conservation des échantillons.

Un point soulevé pendant ce projet est la possibilité de conserver les échantillons sous forme d'ADN extrait à partir de matériel frais, plutôt que sous forme d'échantillons végétaux. Dans cette optique, et dans la lignée de ce projet, nous pourrions comparer l'ADN extrait d'échantillons végétaux conservés à -20 °C avec des ADN extraits de ces mêmes échantillons dans le cadre de nos projets de ces dernières années. Un autre point à évaluer concerne la possibilité de lyophiliser les échantillons à sec, avec un lyophilisateur de qualité, plutôt que de les sécher à l'étuve. Dans cette optique, nous envisageons d'évaluer la quantité/qualité de l'ADN extrait à partir d'échantillons végétaux stockés à -20 °C puis lyophilisés.

De plus, dans le cadre d'un autre projet sur le sapin, où une concentration importante en ADN était demandée pour des analyses de séquençage, nous avons effectué plusieurs modifications du protocole d'extraction. Nous sommes ainsi arrivés à multiplier par quatre la quantité d'ADN extraite. Avec ce protocole modifié, et l'obtention d'une plus grande quantité d'ADN sur du matériel pauvre en ADN de bonne qualité, nous pourrions éventuellement obtenir des données de génétique sur du matériel qui jusqu'à présent ne donnait pas de résultats. Des tests complémentaires, en lien avec les essais présentés dans cet article, seraient nécessaires pour valider cette hypothèse. ■

Références

- Dussert S., Engelmann F., Noirot M., 2003. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *Cryo-letters* : 24, 149-160.
- Esnault F., Pellé R., Dantec J.-P., Bérard A., Le Paslier M.-C., Chauvin J.-E., 2016. Development of a potato cultivar (*Solanum tuberosum* L.) core collection, a valuable tool to prospect genetic variation for novel traits. *Potato Research*, 59, 4 : 329-343. DOI 10.1007/s11540-016-9332-x.
- Fabre J. and Dereuddre J., 1990. Encapsulation dehydration - A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *Cryo-Letters* 11(6) : 413-426.
- Gallard A., 2008. Étude de la cryoconservation d'apex en vue d'une conservation à long terme de ressources génétiques végétales : Compréhension des phénomènes mis en jeu et évaluation de la qualité du matériel régénéré sur le modèle *Pélagonium*. Thèse de doctorat. École doctorale d'Angers.
- Huang B., Ruess H., Liang Q., Colleoni C., Spooner D., 2019. Analyses of 202 plastid genomes elucidate the phylogeny of *Solanum* section *Petota*. *Scientific Reports* 9 : 44-54.
- Hawkes J. G., 1990. *The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources*. Belhaven Press, London.
- Marhadour S., Dargier C., Esnault F., Laversin N., Méar A., Perramant M. and Le Hingrat Y., 2014. Construction d'une base de données multi-utilisateurs pour améliorer la gestion des empreintes génétiques des variétés de pomme de terre produites en plants. *FranceInnovations Agronomiques* 35 : 161-172.
- Mix-Wagner G., 1999. The conservation of potato cultivars. *Potato Research* 42: 427- 436.
- Murashige T. and Skoog F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Kim H. H., Yoon J. W., Park Y.E., Cho E.G., Sohn J.K., Kim T.S., Engelmann F (2006). Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species : Critical factors in droplet vitrification. *Cryo-letters* 27(4) : 223-234.
- Reed B (2021). Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryo-letters* 22: 97-104.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama L (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange by vitrification. *Plant cell reports* vol 9: 30-33.
- Sakai A, Engelmann F (2007). Vitrification, encapsulation-Vitrification and droplet-vitrification : A review. *Cryo-letters* 28(3): 151-172.
- Spooner D., McLean K., Ramsay G., Waugh R., Bryan G. J., 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: N°41.
- Spooner D., 2009. DNA barcoding will frequently fail in complicated groups : An example in wild potatoes. *American journal of botany* 96(6) : 1177-1180.
- Tendille C. and Lecerf M., 1974. La multiplication végétative de l'asperge (*ASPARGUS OFFICINALIS* L.). Action de divers facteurs en particulier la nutrition minérale, sur le développement des méristèmes d'asperge, sur la croissance des plantules issues de ces méristèmes et sur la production de plante adultes. *Annales Amélioration des plantes* 24 (3) : 269-282.

Annexe 1 : Plan de plaque indiquant la position des échantillons

Les cellules en jaune correspondent aux échantillons de cèdre de l'Atlas, en vert de sapin pectiné, en bleu de hêtre et en rose de pin de Salzman. TP indique la position du témoin positif avec son espèce et son identifiant. Pour tous les autres échantillons, sont donnés l'identifiant, le mode de conservation et l'année de récolte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TP cèdre BABO118	BABO118 -20°C 2001 VentFey_6 G1_652	BABO118 -20°C 2008 VentFey_6 G1_653	RIAL2_114 -20°C 2001 VentFey_6 G1_654	CHEL_122 -20°C 2001 VentFey_6 G1_655	TIKJ_123 -20°C 2001	CHEL_122 -20°C 2008 Vent_137	TIKJ_123 -20°C 2008	TP cèdre RIAL2_114 ORIJ_142	MGUI2_147 -20°C 2001	TP cèdre VentFey_0 5_26 VentFey_0 5_23	VentFey_0 5_26 -20°C 2008
B	TP cèdre VentFey_6 G1_653	à sec 2015 TH_60	à sec 2015 TH_60	à sec 2015 TH_60	à sec 2015 TH_60	TP cèdre Vent_137 TH_67	-20°C 2001 TH_67	TP cèdre ORIJ_142 TH_67	-20°C 2001 TH_67	TP cèdre VentFey_0 5_23 TH_100	-20°C 2008 TH_100	Témoin négatif
C	TP sapin TH_60	-20°C 2007 TH_59	-20°C 2011	-20°C 2012 TH_59	à sec 2012 TH_59	-20°C 2012 TH_80	-20°C 2011 TH_80	-20°C 2012 TH_80	à sec 2012	-20°C 2007 TH_100	-20°C 2011	TP sapin TH_67
D	TP sapin TH_59	-20°C 2011 257_2_56a	TH_59 -20°C 2012 257_2_56a à sec 2009	à sec 2012	-20°C 2007	-20°C 2011 257_2_58a à sec 2009	-20°C 2012	-20°C 2007 257_2_64	TP sapin TH_100 257_2_64	-20°C 2012 A7	TP sapin TH_80 B108	Témoin négatif C216
E	TP hêtre 257_2_56a	-20°C 2008 257_2_60a	257_2_60a à sec 2009	TP hêtre 257_2_58a 257_2_62	257_2_58a -20°C 2008 257_2_62	257_2_62	TP hêtre 257_2_64 TP hêtre VTX_68_01	-20°C 2008 individu 1 à sec 2016	à sec 2009 TP hêtre VTX_68_02	numbase 6410 -20°C individu 2 à sec 2016	numbase 6495 -20°C TP hêtre VTX_68_03	numbase 6594 -20°C individu 3 à sec 2016
F	TP hêtre 257_2_60a	-20°C 2008 PNS_1	PNS_2	TP hêtre 257_2_62 PNS_4	-20°C 2008	à sec 2009 PNS_413	ventoux sud PNS_414	PNS_415	ventoux sud TP	PNS_923	ventoux sud PNS_924	PNS_926
G	TP pin PNS_1	-20°C 2008 PNS_31	-20°C 2008 PNS_33	-20°C 2008 PNS_34	TP pin PNS_413	-20°C 2010 PNS_390	-20°C 2010 PNS_391	-20°C 2010 PNS_393	pin PNS_923 TP	-20°C 2012 PNS_689	-20°C 2012 PNS_692	-20°C 2012 PNS_694
H	TP pin PNS_31	-20°C 2009	-20°C 2009	-20°C 2009	TP pin PNS_390	-20°C 2011	-20°C 2011	-20°C 2011	pin PNS_689	-20°C 2011	-20°C 2011	-20°C 2011

Annexe 2 : Amorces et conditions PCR pour les marqueurs microsatellites et l'amplification du fragment de barcoding

Des sets d'amorces microsatellites spécifiques ont été utilisés pour chaque espèce.

Hêtre

NOM DE L'AMORCE	SENS DE L'AMORCE	SÉQUENCE (DE 5' -> 3')	MOTIF	BIBLIOGRAPHIE
MFC7	Forward	AAAATACACTGCCCAAAA	(GA) ⁹	Vornam <i>et al.</i> , 2004
	Reverse	CAGGTTTTGGTTCTTACAC		
Fs3_4	Forward	AGATGCACCACTTCAAATTC	(GCT) ⁶	Pastoreli <i>et al.</i> , 2003
	Reverse	TCTCCTCAGCAACATACCTC		
Fs1_15	Forward	TCAAACCCAGTAAATTTCTCA	(GA) ²⁶	Pastoreli <i>et al.</i> , 2003
	Reverse	GCCTCAATGAACTCAAAAAC		
Sfc1143	Forward	TGGCATCCTACTGTAATTTGAC	(AG) ²¹	Asuka <i>et al.</i> , 2004
	Reverse	ATCCACCCACCATCTGTC		
Sfc0007-2	Forward	TGTCGCAAACATTGACAAGG	(AG) ²⁴	Asuka <i>et al.</i> , 2004
	Reverse	GTGGATGTGAGGTCGTTGG		

Cèdre de l'Atlas

NOM DE L'AMORCE	SENS DE L'AMORCE	SÉQUENCE (DE 5' -> 3')	MOTIF	BIBLIOGRAPHIE
D4	Forward	GCTTTACGCAATTCCTCCTATG	(TC) ⁸ (AC) ⁶	Chaib <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	TGAGAATTGTGAACCATTGAAAG		
C6	Forward	GGGTTATAAGTTTAATTATATGTGTG	(GT) ²⁷ (GA) ¹⁴	Chaib <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	CACCACCTTGACTTCCCTTG		
D12	Forward	TGGTTTTCCACCTTAGTTTCC	(TC) ¹⁵	Chaib <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	GGGATGGAAGGAATAAGATAGAGG		
Pt15169	Forward	CTGGATGGAATAGCAGCC	(C) ⁸ (T) ⁸ A(T) ⁸	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
	Reverse	GGAAGGGCATTAAAGTCATTA		

Sapin pectiné

NOM DE L'AMORCE	SENS DE L'AMORCE	SÉQUENCE (DE 5' -> 3')	MOTIF	BIBLIOGRAPHIE
SF333	Forward	ATTTGTTCAITTTGGTCCTG	(CA)12(TA)4	Cremer <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	ACACAGGAAAAAGTCGGTAA		
SF1	Forward	TTGACGTGATTAACAATCCA	(CCG)9	Cremer <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	AAGAACGACACCATTCTCAC		
SF50	Forward	CATTTGGTGCGGTTCAITTC	(GT)11(GC)10	Cremer <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	AGTGCCATTCACITATTGG		
SF78	Forward	FAM-CATTTGTTGTCITTTGTTTACA	(CGCA)8-(CA)15G(CA)8	Cremer <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	TGCACCGTTTTGTTTTCC		

Pin de Salzmann

NOM DE L'AMORCE	SENS DE L'AMORCE	SÉQUENCE (DE 5' -> 3')	MOTIF	BIBLIOGRAPHIE
Pt1254	Forward	CAATTGGAATGAGAACAGATAGG	(T)17	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
	Reverse	TGCGTTGCACTTCGTTATAG		
Pt15169	Forward	CTTGATGGAATAGCAGCC	(C)8(T)8A(T)8	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
	Reverse	GGAAGGGCATAAGGTCATTA		
Pt87268	Forward	GCCAGGGAAAATCGTAGG	(T)14	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
	Reverse	AGACGATTAGACATCAACCC		
Pt30204	Forward	TCATAGCGGAAGATCCTCTTT	(A)12(G)10	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
	Reverse	CGGATTGATCCTAACCATACC		

Les compositions des mélanges réactionnels de PCR sont différentes entre les espèces :

Mélange réactionnel de PCR pour le hêtre

MÉLANGE RÉACTIONNEL GLOBAL	CONCENTRATION FINALE DANS LE TUBE	VOLUME POUR 1 ÉCHANTILLON (EN µL)	VOLUMES PRÉLEVÉS POUR 100 ÉCHANTILLONS (EN µL)
PCR MASTER MIX (QIAGENTM)	1X	5	500
PRIMERS À 100µM	0.2µM	0.02	2*
Q_SOLUTION (QIAGENTM)	0.5X	1	100
H2O QSP		9	900

*2µl par primer utilisé

Mélange réactionnel pour les PCR sur conifères

MÉLANGE RÉACTIONNEL GLOBAL	CONCENTRATION FINALE DANS LE TUBE	VOLUME POUR 1 ÉCHANTILLON (EN µL)	VOLUMES PRÉLEVÉS POUR 100 ÉCHANTILLONS (EN µL)
PCR MASTER MIX (QIAGENTM)	1X	5	500
PRIMERS À 100µM	0.2µM	0.02	2*
Q_SOLUTION (QIAGENTM)	0.5X	1	100
H2O QSP		9	900

*2µl par primer utilisé

Programme PCR

94 °C durant 15 min (activation de la Taq HotStart présente dans le PCR Master Mix)

94 °C durant 30 s (dénaturation de l'ADN)

57 °C durant 90 s (hybridation des amorces)

72 °C pendant 90 s (élongation des brins d'ADN)

72 °C durant 20 min pour l'élongation finale

4 °C pendant 1 min pour faire redescendre la température et stopper l'activité enzymatique de la Taq polymerase

Amorces barcoding utilisées

CIBLE	NOM DE L'AMORCE	SÉQUENCE (DE 5' -> 3')	BIBLIOGRAPHIE
TRNH_2	trnH(GUG)f_HC	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	Tate et Simpson, 2003
	psbAr_HC	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Entretenir des collections d'invertébrés d'intérêt agronomique sur hôtes vivants : un enjeu patrimonial et des contraintes spécifiques

Sylvie PAGÈS¹
Nadine SELLIER²
Philippe CASTAGNONE²

CORRESPONDANCE

sylvie.pages@inrae.fr

nadine.sellier@inrae.fr

philippe.castagnone@inrae.fr

RÉSUMÉ

L'entretien de collections de ressources biologiques est une nécessité pour la recherche fondamentale et appliquée. Les moyens mis en œuvre dans ce but peuvent être plus ou moins importants en fonction de la nature de ces ressources biologiques qui sont inertes ou vivantes. Les contraintes se font encore plus lourdes si ces ressources biologiques nécessitent la mise en œuvre d'hôtes vivants. Au sein de l'infrastructure de recherche RARe, c'est le cas notamment des collections de nématodes phytoparasites, de nématodes entomopathogènes, et de parasitoïdes oophages. En effet, ces organismes sont des parasites obligatoires, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent pas réaliser leur cycle biologique en l'absence de leur hôte vivant. Cet article décrit ces collections et présente les contraintes spécifiques liées à leur gestion.

MOTS-CLÉS

Nématodes phytoparasites, nématodes entomopathogènes, trichogrammes, ressources biologiques.

1 Diversité, Génomes & Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI), UMR 1333 INRAE / Université de Montpellier, 34095 Montpellier.

2 Institut Sophia Agrobiotech (ISA), UMR 1355 INRAE / Université Côte d'Azur / 7254 CNRS, 06903 Sophia Antipolis

Maintaining collections of invertebrates of agronomic interest on living hosts: a challenge of heritage and specific constraints

Sylvie PAGÈS¹
Nadine SELLIER²
Philippe CASTAGNONE²

CORRESPONDENCE

sylvie.pages@inrae.fr

nadine.sellier@inrae.fr

philippe.castagnone@inrae.fr

ABSTRACT

It is necessary to maintain collections of biological resources for fundamental and applied research. The resources implemented to this end can vary depending on the nature of these biological resources that are inert or living. The constraints become even greater if these biological resources require the utilization of living hosts. In the AgroBRC/RARe research infrastructure, this is the case in particular of collections of plant parasitic nematodes, entomopathogenic nematodes, and oophagous parasitoids. Indeed, these organisms are obligatory parasites, meaning that they cannot fulfil their biological cycle in the absence of their living host. This article describes these collections and presents the constraints specific to their management.

KEYWORDS

Plant parasitic nematodes, entomopathogenic nematodes, trichogramma, biological resources.

¹ Diversité, Génomes & Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI), UMR 1333 INRAE / Université de Montpellier, 34095 Montpellier.

² Institut Sophia Agrobiotech (ISA), UMR 1355 INRAE / Université Côte d'Azur / 7254 CNRS, 06903 Sophia Antipolis

Introduction

Une collection est définie comme un « ensemble d'échantillons de ressources génétiques prélevés et les informations afférentes, rassemblés et stockés, qu'ils soient détenus par les entités publiques ou privées » (Article L412-4 8 du Code de l'Environnement).

Il existe de nombreuses collections au sein d'INRAE, dont certaines concernent des organismes maintenus vivants. Dans cet article, nous avons choisi de présenter trois collections regroupant des invertébrés d'intérêt agronomique, inscrites dans l'infrastructure de recherche RARE (Ressources Agronomiques pour la Recherche), et plus précisément au sein du Pilier Environnement (www.brc4env.fr ; Mougin et al., 2018). La gestion et les moyens mis en œuvre pour la conservation de ces organismes, bien qu'assez comparables à l'ensemble des collections de RARE, présentent toutefois des aspects partagés originaux, notamment une genèse commune et la nécessité de disposer d'un hôte vivant pour assurer leur maintenance.

Dans les années 1970, les travaux de recherches conduits à l'INRA d'Antibes dans le domaine de la protection des cultures se sont orientés vers l'étude de divers macro et microorganismes, qu'ils soient bio-agresseurs ou, au contraire, potentiels agents de lutte biologique, tels que les nématodes phytoparasites, les trichogrammes et les nématodes entomopathogènes. Progressivement, un ensemble de ressources biologiques y ont été rassemblées, maintenues et enrichies, aboutissant à la constitution de collections. Au fil des évolutions structurelles de l'INRA, ces collections ont été transférées en 1999 dans l'unité DGIMI (Diversité, Génomes & Interactions Microorganismes-Insectes) à Montpellier pour les nématodes parasites d'insectes, et en 2004 sur le site de l'unité ISA (Institut Sophia Agrobiotech)

à Sophia Antipolis pour les nématodes parasites de plantes et les trichogrammes.

Ces collections présentent un intérêt fort à titre patrimonial pour les recherches appliquées et/ou fondamentales qui visent à étudier la biodiversité des organismes et répondre aux enjeux majeurs du changement de paradigme de l'agriculture dans le monde. Pour entretenir ces ressources biologiques vivantes et faire vivre les collections, les besoins en installations dédiées, adaptées, ainsi qu'en moyens humains et matériels sont des contraintes majeures, renforcées ici par le besoin de production des hôtes vivants associés.

Présentation des collections

La position systématique des invertébrés d'intérêt agronomique regroupés dans les trois collections décrites ici est présentée dans le tableau 1.

Les nématodes parasites de plantes

Trois collections vivantes de nématodes phytoparasites sont hébergées au sein de l'ISA à Sophia Antipolis, qui concernent des groupes majeurs aux plans agronomique et/ou environnemental : les nématodes à galles (*Meloidogyne* spp.), les nématodes vecteurs du virus du court-noué de la vigne (*Xiphinema* spp.) et les nématodes du pin (*Bursaphelenchus* spp.).

Actuellement, 145 souches échantillonnées à l'échelle mondiale sont multipliées, ce nombre étant évolutif dans le temps :

- *Bursaphelenchus* spp. : 35 souches appartenant à 10 espèces ;
- *Meloidogyne* spp. : 80 souches appartenant à 10 espèces ;
- *Xiphinema* spp. : 30 souches appartenant à 10 espèces.

Tableau 1 : Invertébrés d'intérêt agronomique considérés dans cet article

ORGANISMES	EMBRANCHEMENT	CLASSE	ORDRE	FAMILLE	GENRE
Trichogrammes	Arthropode	Insecta	Hymenoptera	Trichogrammatidae	Trichogramma
Nématodes à galles	Nématode	Chromadorea	Tylenchida	Meloidogynidae	Meloidogyne
Nématodes du pin	Nématode	Chromadorea	Rhabditida	Parasitaphelenchidae	Bursaphelenchus
Nématodes entomopathogènes	Nématode	Secernentea	Rhabditida	Heterhorhabditidae	Heterhorhabditis
Nématodes entomopathogènes	Nématode	Secernentea	Rhabditida	Steinernematidae	Steinernema
Nématodes vecteurs de virus	Nématode	Enoplea	Dorylaimida	Xiphinematidae	Xiphinema

Au sein de l'ISA, les travaux de recherche sur ces ressources biologiques concernent (i) la diversité génétique et l'évolution des nématodes ; (ii) les mécanismes à l'origine du pouvoir pathogène des nématodes ; (iii) les mécanismes de la résistance des plantes aux nématodes ; (iv) les stratégies de lutte contre les nématodes.

Les installations dédiées au maintien de ces collections (serres, locaux techniques, enceintes climatiques, laboratoires ; Figure 1) bénéficient d'un agrément préfectoral pour la manipulation des espèces de quarantaine (*M. chitwoodi*, *M. fallax* et *B. xylophilus*). À ce jour, la distribution hors de l'unité de ces matériels biologiques se fait essentiellement dans le cadre de collaborations avec des partenaires académiques et/ou privés.



Figure 1. Les collections vivantes de nématodes phytoparasites maintenues à l'Institut Sophia Agrobiotech. (A) Nématodes à galles *Meloidogyne* spp. (B) Nématodes vecteurs de virus *Xiphinema* spp. (C). Nématodes du pin *Bursaphelenchus* spp.

Les parasitoïdes oophages

L'ISA héberge également une collection de parasitoïdes oophages, des insectes hyménoptères dont le développement pré-imaginal, avant le stade adulte, se fait à l'intérieur d'un

œuf hôte, finissant par le tuer. Cette collection, dénommée EP-Coll (pour Egg Parasitoids Collection), est reconnue en tant que Centre de Ressources Biologiques (CRB ; <https://www6.inrae.fr/crb-eggparasitoids-coll/>), labellisée par le GIS IBiSA (Infrastructures en Biologie, Santé et Agronomie) depuis 2015 et certifiée ISO 9001:2015 depuis 2018. Ces marques de reconnaissance lui permettent de s'inscrire dans le réseau RARe et de garantir la qualité de son organisation. Si, à terme, l'objectif du CRB EP-Coll est d'élargir sa collection à d'autres genres, actuellement il est centré sur le genre *Trichogramma* ; ce dernier constitue l'un des premiers marchés commerciaux dans le cadre de la lutte biologique à l'aide de macro-organismes (Smith, 1996 ; Consoli et al., 2010) et une source potentielle de nouveaux agents de lutte biologique contre les lépidoptères nuisibles (Figueiredo et al., 2015 ; Uelesen et al., 2014).

Un trichogramme est un hyménoptère d'environ 1 mm, dont l'élevage se fait dans des tubes en verre bouchés avec du coton (Figure 2B), avec un apport de miel et la fourniture d'œufs vivants d'*Ephestia kuehniella* (la teigne de la farine). Ces tubes sont placés dans une pièce dont les conditions abiotiques sont contrôlées. Le cycle de vie est de l'ordre de 3 à 4 semaines à 18 °C. L'origine de ces souches peut être exotique, c'est pour cela que la collection est maintenue dans un bâtiment confiné, bénéficiant d'agrément pour la détention d'organismes de quarantaine.

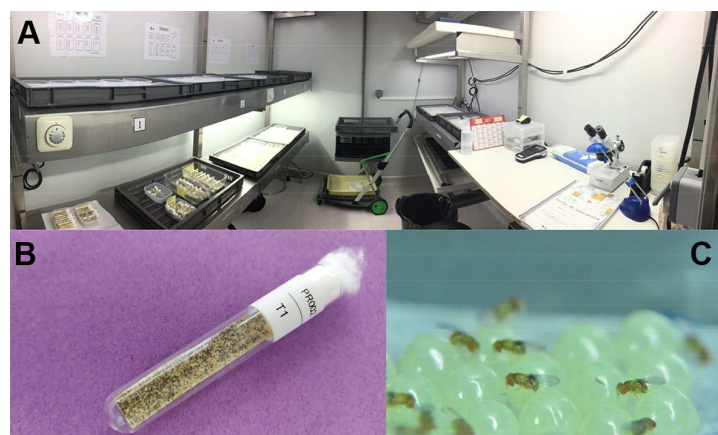


Figure 2 : (A) Laboratoire pour la gestion des souches de trichogrammes. (B) Tube d'élevage d'une souche de trichogrammes. (C) Femelles de trichogrammes en train de pondre dans des œufs de *Spilosoma lutea*.

La collection du CRB représente un catalogue d'environ 130 souches vivantes caractérisées. Une souche est définie comme une combinaison d'une espèce, d'une origine géographique, d'un type de climat, d'une plante et/ou insectes hôtes, voire d'un haplotype « rare », pouvant présenter un intérêt pour la caractérisation de la biodiversité ou la lutte biologique. En parallèle, environ 200 souches en cours

de caractérisation morphologique et phénotypique sont également entretenues pour l'activité de R&D du CRB. La distribution de ces ressources biologiques se fait essentiellement dans le cadre de collaborations avec des partenaires académiques (ex : projets ANR, AAP Ecophyto Maturation, etc.) et/ou privés.

Les nématodes parasites d'insectes

La collection de nématodes entomopathogènes (NEPs ; *Steinernematidae*, *Heterorhabditidae*) est hébergée dans l'UMR DGIMI à Montpellier. Les souches les plus anciennes sont conservées dans la collection depuis les années 1980. Cette collection est source de collaborations et d'échanges de ressources biologiques avec des laboratoires européens et aussi dans le monde entier (États-Unis, Rép. Tchèque, Liban...).

Les larves de NEPs sont des agents de biocontrôle à forte valeur ajoutée, utilisés en agriculture biologique contre les insectes ravageurs pour protéger les plantes cultivées en serre (ex : charançons du fraisier), dans les vergers (ex : carpocapse des pommiers) ou chez les particuliers. Des travaux antérieurs ont montré leur efficacité au champ, en milieu insulaire et tropical pour les cultures d'agrumes ou de canne à sucre (Mauléon et al., 1993).

Ce sont des vers ronds anguilliformes de petite taille (300 µm à 1,2 mm), ubiquistes, présents sur tous les continents sauf en Antarctique et vivant libres dans les sols, préférentiellement dans les sols sableux ; ils sont retrouvés dans les prairies, les forêts et potentiellement dans les parcelles cultivées. Ils se reproduisent dans les larves d'insectes, le cycle de développement parasitaire comprend 4 stades larvaires, des œufs et des adultes.

La collection des NEPs comprend 130 souches et ce nombre est évolutif dans le temps :

- *Steinernematidae* : 87 souches regroupant 15 espèces différentes ;
- *Heterorhabditidae* : 43 souches regroupant 4 espèces différentes.

Les travaux menés sur cette collection concernent (i) la taxinomie des NEPs, la taxinomie et la génomique de leurs microbiotes associés ; (ii) l'étude des mécanismes d'interactions existant entre les nématodes, les bactéries et les insectes hôtes ; (iii) la spécificité d'hôtes. Par exemple, dans le cadre du plan Ecophyto, l'unité DGIMI a bénéficié de financements pour travailler sur l'utilisation et l'optimisation des NEPs comme agents de biocontrôle. Ces projets portaient sur la recherche de méthodes alternatives au traitement chimique pour lutter contre l'un des

ravageurs de culture majeur en France, le taupin (*Agriotes* spp.) (Campos-Herrera & Gutierrez, 2009).

Production des hôtes vivants pour le maintien des collections

Les trois collections décrites dans cet article ont un point commun fort et original, à savoir qu'elles doivent être entretenues vivantes, en passant par un ou plusieurs hôtes vivants (Figure 3). Le tableau 2 résume les conditions de multiplication pratiquées dans nos laboratoires.

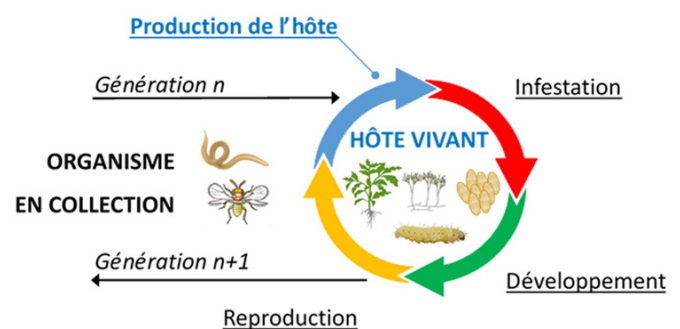


Figure 3. Représentation schématique du processus de mise en collection d'un organisme d'intérêt (nématode, insecte) sur un hôte vivant (plante, oeuf ou larve d'insecte, champignon). Pour des informations spécifiques à chaque organisme concerné, voir le texte.

Pour les nématodes à galles et les nématodes vecteurs de virus, le cycle biologique est simple et ne fait intervenir qu'un hôte végétal. Les nématodes du pin présentent un cycle biologique plus complexe faisant intervenir *in natura* un insecte vecteur, un hôte principal (le pin) et un hôte secondaire (des champignons associés au pin). Cependant, en conditions contrôlées, les nématodes du pin peuvent être multipliés sur champignon sans passer par l'hôte végétal (phase fongivore). Pour maintenir la reproduction des nématodes en continu, il est nécessaire de produire très régulièrement des hôtes adaptés (tomates et figuiers en pots pour *Meloidogyne*, *Botrytis cinerea* sur milieu de culture gélosé pour *Bursaphelenchus*). À noter que pour *Xiphinema*, l'hôte est une plante pérenne (vigne), il n'est donc pas nécessaire de procéder à des repiquages aussi fréquents. Cette production des hôtes vivants, entièrement réalisée sur site, est une étape indispensable - et chronophage - à la maintenance des collections. Ceci est particulièrement vrai pour la collection de nématodes à galles, dont le repiquage systématique est réalisé toutes les six à huit semaines. De plus, pour les deux collections maintenues en serre, l'état physiologique et sanitaire des plantes hôtes doit être contrôlé quotidiennement.

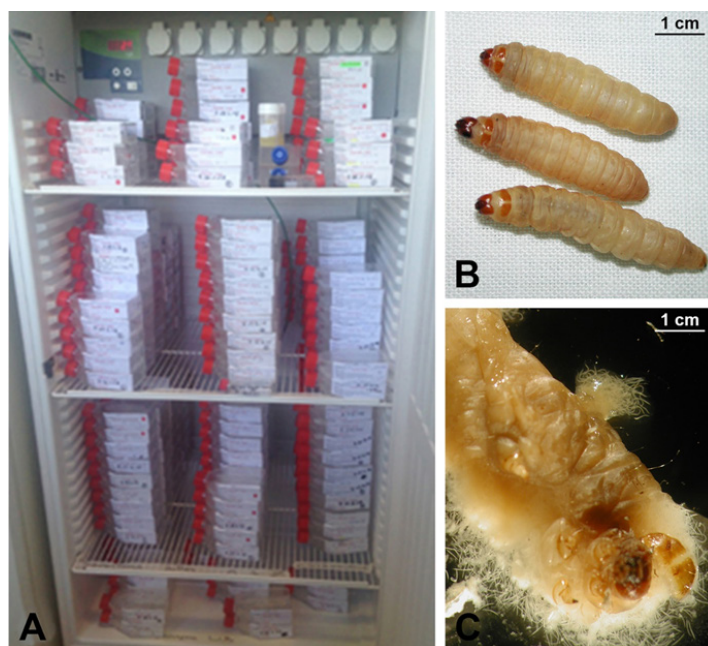
Tableau 2 : Les conditions de multiplication des collections

	HÔTE	ESPACE DÉDIÉ	NÉCESSITÉ DE CONFINEMENT	TEMPÉRATURE (°C)	DURÉE DU CYCLE DANS CES CONDITIONS
NÉMATODES PHYTOPATHOGÈNES					
<i>Bursaphelenchus</i> spp.	<i>Botrytis cinerea</i>	Enceinte climatique	Oui	13 - 15	Environ 2 semaines
<i>Meloidogyne</i> spp.	Tomate, figuier	Serre	Oui	Ambiante	De 6 à 8 semaines
<i>Xiphinema</i> spp.	Vigne	Serre	Non	Ambiante	De 2 à 4 mois
NÉMATODES ENTOMOPATHOGÈNES					
<i>Heterorhabditis</i> spp.	<i>Galleria mellonella</i>	Enceinte climatique	Non	15	De 2 à 6 mois
<i>Steinernema</i> spp.	<i>Galleria mellonella</i>	Enceinte climatique	Non	9	De 6 à 9 mois
TRICHOGRAMMES					
<i>Trichogramma</i> spp.	<i>Ephestia kuehniella</i>	Pièces climatiques	Oui	18	Environ 3 semaines

Les trichogrammes sont reproduits sur des œufs d'*E. kuehniella* (Lépidoptère) livrés chaque semaine par une bio-fabrique située en France. À la réception des œufs, un contrôle qualité est réalisé afin de s'assurer que les œufs n'ont pas été « contaminés » par d'éventuels trichogrammes sauvages. Pour le renouvellement d'une population de trichogrammes, les œufs d'*Ephestia*, conservés à 4 °C, sont collés sur des bandelettes de papier adhésif et préalablement « stérilisés » aux rayons UV pendant 20 mn, afin de garantir qu'aucune larve de lépidoptère n'émergera risquant de dévorer les œufs parasités, entraînant ainsi la perte de la population de trichogrammes. Les souches de trichogrammes ne sont pas « synchronisées », le renouvellement est donc étalé dans le temps, et chaque jour il peut être nécessaire de mettre des œufs d'*Ephestia* à disposition d'un groupe de souches, d'où une contrainte forte de surveillance quotidienne.

Les populations de nématodes entomopathogènes sont produites en masse sur des larves de l'insecte *Galleria mellonella* (Teigne des ruches, Lépidoptère), qui est un hôte sans contrainte particulières d'élevage et très permissif aux nématodes. Au sein de l'unité DGIMI, le personnel de l'insectarium assure l'élevage et la production de *Galleria* en quantité suffisante pour pérenniser le renouvellement régulier des souches de la collection des nématodes. Parfois, pour répondre à certains besoins en recherche, la production des NEPs est réalisée avec des hôtes dits de « quarantaine » nécessitant une structure confinée. Après l'étape d'infestation de l'hôte, le cycle parasitaire se réalise dans le cadavre de la larve d'insecte, et la génération n+1 qui émerge du cadavre (Figure 4A) est récoltée au bout de 3 à 4 semaines pour conservation. La récolte est stockée

dans des flacons de culture de 250 mL dans une solution de Ringer dans des enceintes thermostatées réfrigérées à porte pleine, car les nématodes entomopathogènes sont sensibles aux UV qui leur font perdre leur pouvoir infestant (Figure 4B). La majorité des souches est renouvelée deux fois par an. Certaines souches plus fragiles nécessitent un renouvellement plus fréquent, par exemple tous les deux mois pour l'espèce *Heterorhabditis indica*. Pour une gestion plus sereine et pour limiter la surcharge de travail, un renouvellement de dix à quinze souches chaque mois est planifié.



Contraintes communes aux trois collections

Température

La température est un facteur abiotique important pour la conservation de chacune des collections (Tableau 2) et doit être contrôlée en permanence. Par exemple, à l'ISA, ce contrôle se fait par des enregistreurs pilotés par un système de gestion centralisée et reliés à un logiciel de surveillance et d'alarme. Dans le cas des nématodes entomopathogènes, le renouvellement des souches (génération $n+1$) se fait généralement à 23 °C, mais la température d'infestation varie selon l'origine des souches entre 18 °C et 28 °C. Si la température est inadaptée, cela entraîne une diminution de la production, qui peut conduire à la perte de la souche au fil des générations. En 2017, une panne d'enceintes réfrigérées a entraîné la perte de 20 % des souches de la collection.

Caractérisation spécifique

À l'échelle des trois types d'organismes considérés ici, seules les approches de caractérisation biochimique et/ou moléculaire peuvent être mises en œuvre pour distinguer les espèces de manière fiable et s'assurer de l'absence de mélanges et/ou de contaminations, sans recourir à l'expertise d'un spécialiste en taxinomie.

Dans le cas des trichogrammes, c'est le séquençage d'une portion du gène codant pour la première sous-unité de la cytochrome oxydase (COI), protéine mitochondriale de la chaîne respiratoire, qui est utilisé en routine pour caractériser rapidement la biodiversité des taxons (Al khatib et al., 2014 ; Correa et al., 2016). Cette méthode consiste, à partir d'individus identifiés morphologiquement et assignés à une espèce, à associer les séquences COI correspondantes. Par la suite, les séquences identiques ou proches pourront être assignées aux espèces correspondantes.

Dans le cas des nématodes phytoparasites, afin de permettre la caractérisation spécifique des souches en collection et identifier d'éventuels mélanges, différents marqueurs biochimiques (isoestérases) ou moléculaires (ADN satellite, SCAR, ADN ribosomique, ADN mitochondrial) sont utilisés en routine au laboratoire.

La caractérisation des espèces de nématodes entomopathogènes est réalisée en routine par des méthodes moléculaires basées sur le séquençage du gène codant de l'ARNr 28S ou de la région intergénique ITS. La morphométrie reste, cependant, la méthode de référence utilisée dans la littérature scientifique pour la caractérisation taxinomique de nouvelles espèces.

Organisation du travail

La réception, le renouvellement des populations dans les meilleures conditions, c'est-à-dire sans perte de souches et sans contaminations entre souches, ainsi que la mise à disposition de matériel biologique nécessitent une organisation solide, avec des contraintes ponctuelles et récurrentes, mais aussi d'autres irrégulières, exigeant une bonne coordination des tâches. Certains CRB bénéficient de personnel dédié à 100 %, pour l'entretien, le renouvellement des élevages et l'enregistrement des données associées, c'est le cas du CRB EP-Coll, mais d'autres n'ont pas cette chance et doivent faire face à des problématiques d'organisation fortes, pour être en mesure d'assurer la grande diversité des tâches afférentes au maintien des collections vivantes. Un volant très important de l'activité concerne la gestion des données associées au matériel biologique, qui peut se faire à l'aide d'outils dédiés (SI Biolomics, Système d'Information déployé au sein de RARe dans plusieurs CRB par exemple), ou bien avec des moyens plus restreints, comme pour la collection des nématodes entomopathogènes où l'ensemble des données est actuellement stocké dans différents fichiers Excel.

De plus, depuis quelques années, la détention et l'utilisation de ressources biologiques sont soumises à des réglementations (Protocole de Nagoya, Règlementation européenne, Loi Française). D'un point de vue juridique, le gestionnaire de collections doit pouvoir renseigner les utilisateurs dans le cadre de contrats privés ou publics et transmettre, si nécessaire, les documents ad hoc selon l'origine de la ressource.

Agréments/Confinement

Pour les trichogrammes, une distinction doit être faite selon l'origine géographique des souches. En effet, alors que la détention d'organismes issus de France Métropolitaine ne nécessite pas d'autorisation, la détention de ceux provenant d'autres aires géographiques nécessite un accord préalable, conformément à l'arrêté du 28/06/2012 portant sur les macroorganismes indigènes utilisables en lutte biologique (référence : AGRG1225395A).

Certaines des espèces de nématodes phytoparasites détenues à l'ISA sont des organismes de quarantaine (par exemple, *B. xylophilus* ou *M. chitwoodi*), qui doivent impérativement être manipulés dans des installations confinées et bénéficiant d'un agrément préfectoral au titre du règlement 2019/829/CE.

Efforts en Recherche & Développement

Allongement du temps intergénérationnel

L'entretien de ces collections d'organismes vivants, qui nécessitent obligatoirement au cours de leur cycle de vie un hôte vivant dont la production ou l'approvisionnement est géré par le laboratoire, est particulièrement chronophage. Du personnel dédié n'est pas toujours disponible, et des voies d'améliorations doivent être recherchées pour réduire le temps consacré au renouvellement des générations. Plusieurs pistes sont explorées, telle que la cryopréservation dans l'azote liquide pour les nématodes phytoparasites, en adaptant des protocoles déjà expérimentés sur les nématodes à galles (Carneiro et al., 2005 ; Irdani et al., 2011 ; Van der Beek et al., 1996). Les premiers résultats sont encourageants quant à la survie des individus, mais le protocole nécessite des essais complémentaires pour évaluer le pouvoir infestant des nématodes après décongélation.

Des études portant sur l'induction de périodes de quiescence ou de diapause sont également en cours sur les trichogrammes, en jouant sur des expositions à des températures et des photopériodes adaptées et appliquées à des stades précis du développement de l'embryon à l'intérieur de son hôte. Là encore, les premiers résultats sont encourageants, mais mettent en évidence des variabilités importantes entre espèces notamment, et nécessitent d'être approfondis.

La cryoconservation des NEPs a été pratiquée, mais elle n'est pas un moyen de conservation utilisé dans le laboratoire, car la méthodologie doit être adaptée à chaque espèce.

Amélioration des outils de caractérisation moléculaire

Même si certaines méthodes d'identification moléculaire sont déjà utilisées en routine sur les trois collections, les recherches se poursuivent pour développer de nouvelles approches qui soient plus fiables et plus discriminantes. Afin de détecter plus efficacement et plus rapidement les possibles contaminations entre souches de trichogrammes, le CRB Ep-Coll, en collaboration avec des collègues du CBGP (Centre de Biologie et de Gestion des populations, Montpellier), travaille à la mise au point d'une nouvelle méthode de vérification, applicable directement sur des pools d'indi-

vidus, à l'aide des technologies NGS (séquençage nouvelle génération). En ciblant à nouveau le gène mitochondrial COI, le protocole combine deux amplifications PCR successives et un séquençage avec le système Illumina MiSeq. Pour ce qui concerne les nématodes parasites de plantes, l'objectif est d'amener le pouvoir de résolution au niveau infra spécifique, afin de différencier aisément les isolats appartenant à la même espèce. L'approche par séquençage NGS est également privilégiée.

Amélioration du protocole d'infestation

Des pertes récurrentes de certaines espèces de nématodes entomopathogènes ont conduit à modifier des paramètres importants liés aux conditions de renouvellement des souches. En effet, des études ont montré que la durée du stockage et la température ont un effet sur le pouvoir infestant des NEPs (Molyneux, 1985 ; Stauch et al., 2000 ; Lalramliana & Yadav, 2016). Les premiers résultats d'une étude menée sur une espèce de la collection se sont avérés concluants et ont permis d'adapter la méthodologie. Dans le cadre d'une démarche d'Assurance Qualité, l'objectif est maintenant d'étendre les expérimentations à d'autres espèces, afin de déterminer les conditions optimales pour garantir une survie et une infectivité maximales de l'ensemble des souches.

Conclusion

La gestion d'une collection n'est pas seulement et simplement limitée à l'accumulation d'échantillons inertes ou de populations d'organismes vivants, accompagnés ou non de leurs organismes hôtes associés, mais procède bien d'un processus dynamique, avec l'entrée et la sortie de souches au fil du temps. Elle s'accompagne de la manipulation d'une somme considérable de données caractérisant ces ressources. Cet ensemble représente une richesse inestimable, source de projets de recherche et réservoir de potentiels agents de lutte biologique (cas des trichogrammes et des NEPs) qui doit être pérennisée dans le temps. Pour cela, une organisation collective avec des moyens humains complémentaires, en termes de compétences scientifiques et techniques, ainsi que des moyens matériels adaptés, doit être mobilisée. ■

Remerciements

Ces trois collections ne pourraient pas exister sans l'investissement quotidien de nombreux collègues des unités ISA et DGIMI, que nous remercions chaleureusement. Nous adressons également nos remerciements au Département Santé des Plantes et Environnement (SPE) pour les moyens humains et matériels qui nous ont été attribués, au cours des dernières années, pour le maintien des collections. Enfin, nous remercions la CNUE, l'infrastructure RARe et le GIS IBISA pour leur soutien en moyens d'équipement et de fonctionnement.

Références

- Al Khatib F., Fusu L., Cruaud A., Gibson G., Borowiec N., Rasplus J.Y., Ris N and Delvare G., 2014. An integrative approach to species discrimination in the *Eupelmus urozonus* complex (Hymenoptera, Eupelmidae), with the description of 11 new species from the Western Palaearctic. *Systematic Entomology* 39(4) : 806-862.
- Campos-Herrera R. and Gutiérrez C., 2009. Screening Spanish isolates of steinernematid nematodes for use as biological control agents through laboratory and greenhouse microcosm studies, *Journal of Invertebrate Pathology* 100(2) : 100-105.
- Carneiro R.M.D.G., Martins I., Oliveira Teixeira A.C. and De Castro Mota F., 2005. Freezing and storing *Meloidogyne* spp. in liquid nitrogen. *Nematologia Brasileira* 29 : 221-224.
- Consoli F.L., Parra J.R.P. and R.A. Zucchi, 2010. *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma* Springer Netherlands.
- Correa M.C.G., Palero F., Dubreuil N., Etienne L., Hulak M., Tison G., Warot S., Crochard D., Ris N. and Kreiter P., 2016. Molecular characterization of parasitoids from armored scales infesting citrus orchards in Corsica, France. *BioControl*, on Line first. *BioControl* 61 : 639-647.
- Figueiredo M.D.C., Cruz I., da Silva R.B. and Foster J.E., 2015. Biological control with *Trichogramma pretiosum* increases organic maize productivity by 19.4%. *Agronomy for Sustainable Development* 35(3) : 1175-1183.
- Irdani T., Scotto C. and Roversi P.F., 2011. Low cryoprotectant concentrations and fast cooling for nematode cryostorage. *Cryobiology* 63 : 12-16.
- Lalramliana and Yadav A.K., 2016. Effects of storage temperature on survival and infectivity of three indigenous entomopathogenic nematodes strains (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) from Meghalaya, India. *Journal of Parasitic Diseases* 40 : 1150-1154.
- Mauléon H., Barré N. and Panoma S., 1993. Pathogenicity of 17 isolates of entomophagous nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) for the ticks *Amblyomma variegatum* (Fabricius), *Boophilus microplus* (Canestrini) and *Boophilus annulatus* (Say). *Experimental and Applied Acarology* 17(11) : 831-838.
- Molyneux A.S., 1985. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. (Nematoda : Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects. *Revue de Nématologie* 8 : 165-170.
- Mouglin C., Artige E., Marchand F., Mondy S., Ratié C., Sellier N., Castagnone-Sereno P., Coeur D'Acier A., Esmenjaud D., Faivre-Primot C., Hamelet V., Granjon L., Lange F., Pagès S., Rimet F., Ris N., and Sallé G., 2018. BRC4Env, a network of Biological Resource Centres for research in environmental and agricultural sciences. *Environmental Science and Pollution Research* 25 : 33849-33857.
- Smith S.M., 1996. Biological control with *Trichogramma*. Advances, successes, and potential of their use. *Annual Review of Entomology* 41 : 375-406.
- Strauch O., Niemann I., Neumann A. et al., 2000. Stockage et formulation des nématodes entomopathogènes *Heterorhabditis indica* et *H. bacteriophora*. *BioControl* 45 : 483-500.
- Ueese A., Ridland P.M., Stouthamer R., He Y.R., Ang G., Zalucki M.P. and Furlong M.J., 2014. *Trichogramma chilonis* Ishii: A potential biological control agent of *Crociodolomia pavonana* in Samoa. *Biological Control* 73 : 31-38.
- Van der Beek H.J.G., Veldhuis W.B.J., Zijlstra C. and Van Silfhout C.H., 1996. Preservation of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi* in liquid nitrogen: Differences in response between populations. *Fundamental and Applied Nematology* 19 : 227-234.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Interprétation de l'âge à partir des écailles sur des espèces de salmonidés lacustres, le corégone (*Coregonus sp.*) et l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*)

Valérie HAMELET¹
Chloé GOULON²
Frédéric MARCHAND²

CORRESPONDANCE

valerie.hamelet@inrae.fr

RÉSUMÉ

La connaissance de la croissance et de la structure en âge d'une population de poisson est particulièrement importante lorsque l'on s'intéresse à la dynamique des populations exploitées et à leur gestion. Le Centre de Ressources Biologiques Colisa assure cette expertise à partir de différents échantillons (écailles, otolithes, opercules ...). L'objectif de cet article est de décrire comment se fait cette interprétation de l'âge à partir des écailles sur des espèces de salmonidés lacustres, le corégone (*Coregonus sp.*) et l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*).

MOTS-CLÉS

Scalimétrie, écaille, âge, croissance, omble chevalier, corégone.

1 Université Savoie Mont-Blanc, INRAE, UMR CARRETEL, 75 bis avenue de Corzent, Thonon-les-Bains Cedex, 74203, France.

2 INRAE, pôle OFB-INRAE-L'Institut Agro-UPPA pour la gestion des migrateurs amphihalins dans leurs environnements, U3E, F-35042 Rennes, France.

Interpretation of age based on the scales of lacustrine Salmonidae, the common whitefish (*Coregonus sp.*) and the arctic char (*Salvelinus alpinus*)

Valérie HAMELET¹
Chloé GOULON²
Frédéric MARCHAND²

CORRESPONDENCE

valerie.hamelet@inrae.fr

ABSTRACT

Knowledge of the growth and structure in terms of age of a fish population is very important when focusing on the dynamics of the populations exploited and their management. The Colisa Biological Resource Centre provides this expertise based on different samples (scales, otoliths, gill covers, etc.). The aim of this article is to describe this interpretation of age based on the scales of lacustrine Salmonidae species, the common whitefish (*Coregonus sp.*) and the arctic char (*Salvelinus alpinus*).

KEYWORDS

Scale reading, scale, age, growth, arctic char, common whitefish.

¹ Université Savoie Mont-Blanc, INRAE, UMR CARRETEL, 75 bis avenue de Corzent, Thonon-les-Bains Cedex, 74203, France.

² INRAE, pôle OFB-INRAE-L'Institut Agro-UPPA pour la gestion des migrateurs amphihalins dans leurs environnements, U3E, F-35042 Rennes, France.

Introduction

Depuis 1985, l'INRA et aujourd'hui le CARRTEL (Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques et Écosystèmes Limniques, UMR INRAE/USMB) mettent en œuvre des suivis des populations de poissons dans les grands lacs périalpins (lacs de l'observatoire OLA, Rimet et al., 2020). Dans ces lacs, il existe un fort potentiel halieutique (pêche amateur et professionnelle), et où étaient présentes des populations de salmonidés : ombles chevaliers (*Salvelinus alpinus*) et corégones (*Coregonus* sp.). Dans la plupart des lacs périalpins, les populations de salmonidés ont drastiquement chuté dès les années 1980, notamment à cause de l'eutrophisation.

Le CARRTEL s'intéresse particulièrement aux salmonidés lacustres, le corégone (*Coregonus* sp.) et l'omble chevalier, espèces emblématiques, autochtones et espèces d'intérêt pour la pêche amateur (~1 000 pêcheurs) et la pêche professionnelle (environ 150 pêcheurs). Ces espèces se situent en limite sud de leur aire naturelle de répartition et sont, en tant qu'espèce d'eau froide, vulnérables au réchauffement climatique. Pour mieux comprendre les dynamiques et gérer ces espèces durablement, la scalimétrie est un outil essentiel.

Espèces étudiées

Le corégone est un poisson essentiellement lacustre, d'eau froide et principalement zooplanctonophage. Il peut occuper des plans d'eau variés : lacs, barrages-réservoirs, ballastières et étangs froids. En France, il est essentiellement présent dans la région Auvergne-Rhône-Alpes (dans les grands lacs subalpins: Léman, Annecy, Bourget, mais aussi dans des lacs plus petits : Aiguebelette, Nantua, Paladru, etc.) et en Franche-Comté (lacs du Jura). L'omble chevalier est aussi un salmonidé d'eau froide. L'espèce peut se rencontrer dans des milieux très différents (lacs, rivières...) et est sédentaire dans les lacs périalpins. Son comportement alimentaire peut être très variable (planctonophage, benthophage, ichthyophage) (Keith et al., 2020).

Principes de la Scalimétrie

La scalimétrie est une méthode permettant de déterminer l'âge et la croissance des poissons à partir de leurs écailles (Panfili et al., 2002) et plus précisément à partir des stries de croissances qu'elles affichent. Les écailles grandissent en même temps que le poisson par dépôt de couches concentriques. Cela se traduit sur la partie antérieure de

l'écaille, incluse dans le derme, par la formation de circuli. Dans les régions tempérées, les poissons présentent un rythme de croissance avec deux phases : une croissance rapide au printemps et en été, puis un ralentissement en automne, puis un arrêt en hiver. Le schéma annuel de croissance se retrouve sur l'écaille par la disposition des circuli. Une croissance rapide se traduit par une distance inter circuli espacée tandis que celle-ci se resserre lorsque la croissance des poissons se ralentit et forme un anneau plus foncé, appelé annulus. Le nombre de ces anneaux donne l'âge du poisson (Figure 1).

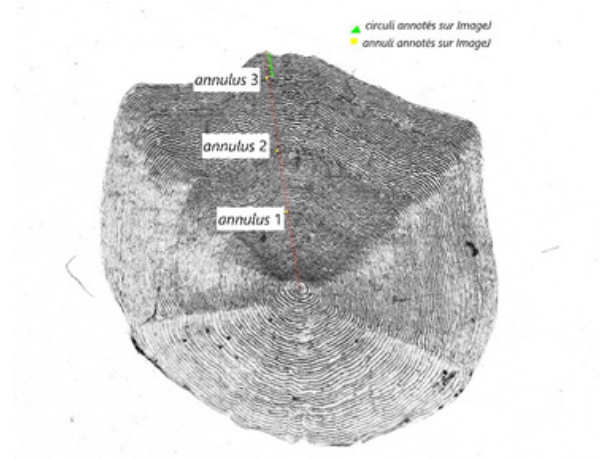


Figure 1. Écailles de corégone et positionnement des annuli et circuli

Prélèvements et préparation des écailles

La lecture des écailles est la plus exploitable si le prélèvement est effectué juste avant ou pendant la phase d'arrêt de croissance. La période la plus critique est le printemps, car la date de la reprise de croissance n'est ni fixe ni simultanée pour les individus d'une même espèce.

Le choix d'une zone optimale de prélèvement est un préalable indispensable à toutes utilisations des écailles. Une zone standard de prélèvement des écailles a été définie chez le corégone et l'omble chevalier (Gerdeaux, 1992 ; Janjua et al., 2010). Cette zone se situe au-dessus de la ligne latérale sur une droite joignant l'arrière de la nageoire dorsale et l'avant de la nageoire anale. Elle possède des écailles de forme typique, plus lisibles et faiblement régénérées (Figure 2).

Les écailles sont prélevées en nombre suffisant en raclant la peau du poisson avec un scalpel ou un couteau. Les écailles ainsi prélevées sont conservées à sec dans des sachets papiers pour une bonne conservation.

Compte tenu de la variabilité de la taille et de la morphologie des écailles au sein d'un même site de prélèvement, il est nécessaire d'observer plusieurs écailles. De même, une blessure entraînera la formation d'écailles régénérées où

les circuli se disposeront au départ en désordre avant de reprendre leur régularité concentrique. Avant toute préparation, la première étape est donc de faire une sélection des écailles sous loupe binoculaire (sélection d'écailles non régénérées, lisibles...).

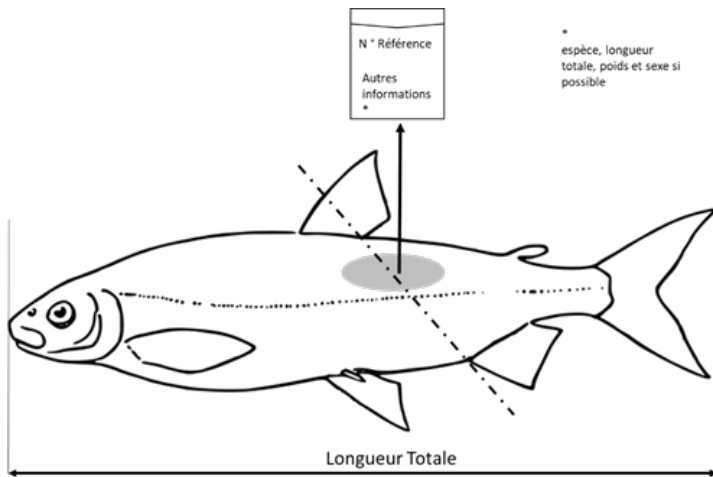


Figure 2. Zone de prélèvement d'écailles chez le corégone et l'omble chevalier

Pour les corégones, quatre écailles (Gerdeaux, 1992) sont sélectionnées pour le nettoyage, une dizaine pour l'omble chevalier. Parce que les écailles sont partiellement recouvertes de résidu du derme, de mucus et de pigments, il est indispensable de les nettoyer avant leur interprétation. Les écailles sont mises à tremper dans une solution de peroxyde de sodium à 5 % durant quelques minutes puis rincées dans l'eau douce. Pour les corégones, les quatre écailles sont positionnées entre deux plaques de verres pour avoir une surface de l'écaille plane et obtenir une bonne mise au point lors de la prise de photo. Les photos

des écailles sont faites à sec juste après le nettoyage. Les lectures et les mesures se font sur les écailles numérisées à l'aide du logiciel ImageJ. On réalise la même procédure pour les écailles d'omble chevalier, la seule différence est que les écailles sont montées entre deux lames de verre.

Sources d'erreurs

Les erreurs de détermination de l'âge proviennent d'une périodicité non annuelle de la formation des anneaux due soit à leur absence, soit à la présence de « faux anneaux ». Les marques de fraie peuvent également complètement éroder les écailles et effacer un ou plusieurs anneaux périphériques. Les erreurs ont tendance à augmenter avec l'âge du poisson. Dans les milieux où la croissance est faible, l'anneau hivernal peut ne plus se former sur les écailles des individus âgés. De même, dès l'apparition de la maturation sexuelle, la croissance se ralentit et l'écaille peut devenir difficilement interprétable. Tout choc physiologique va se marquer sur la vitesse de croissance pouvant entraîner, sur l'écaille, le resserrement de quelques circuli appelé « check » ou faux anneau. Ces chocs peuvent être dus à des stress de capture, des variations quantitatives de l'alimentation, des changements de milieux, des maladies ou des parasites. Une amélioration des déterminations d'âge est apportée par la comparaison des résultats de plusieurs lecteurs ou avec d'autres pièces osseuses, mais seule une validation directe ou indirecte (marquage, étude de la zone marginale, ...) permet d'améliorer la justesse des déterminations. Une étude détaillée et des connaissances préliminaires de la population et de son environnement permettent également une meilleure interprétation. ■

Références

- Gerdeaux D., 1992. Variabilité des mesures scalimétriques chez les corégones du Lac d'Annecy. In : Baglinière J.L. (ed.), Castanet J. (ed.), Conand François (ed.), Meunier F.J. (ed.) Tissus durs et âge individuel des vertébrés. Paris : ORSTOM ; INRA, 211-220. (Colloques et Séminaires). Colloque National, Bondy (FRA), 1991/03/4-6. ISBN 2-7099-1071-3 (ORSTO).
- Janjua M. Y., Zanella D. & Gerdeaux D., 2010. Comparative effectiveness, growth and dispersal of stocked Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from different origins in Lake Annecy. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (397). 04.
- Keith P., Poulet N., Denys G., Changeux T., Feunteun É. & Persat H. (coord.), 2020. Les Poissons d'eau douce de France. Deuxième édition. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris ; Biotopie, Mèze, 704 p. (Inventaires & biodiversité ; 18).
- Panfili J., De Pontual H., Troadec H., Wright P.J., 2002. Manuel de sclérochronologie des poissons. IRD (Ed.), 467p.
- Rimet F., O. Anneville D. Barbet and others., 2020. The Observatory on LAkes (OLA) database: Sixty years of environmental data accessible to the public. *J Limnol*. doi:10.4081/jlimnol.2020.1944.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Les automates de phénotypage à haut débit du CIRM

David NAVARRO^{1,2}
Victoria CHUAT³

CORRESPONDANCE
victoria.chuat@inrae.fr

Le Centre International de Ressources Microbiennes (CIRM) est un Groupe-ment d'Intérêt Scientifique (GIS), créé en 2004 par l'INRA, qui a pour vocation la préservation, l'enrichissement et la valorisation de la diversité microbienne présente dans ses collections. Il compte aujourd'hui plus de 22 000 souches de champignons filamenteux, levures et bactéries.

Les collections du CIRM ont la particularité d'être spécialisées, les ressources biologiques hébergées étant liées à des thématiques précises : des Levures d'intérêt biotechnologique, des Bactéries d'intérêt alimentaire, pathogènes des animaux et de l'Homme, associées aux Plantes, et des Champignons Filamenteux d'intérêt agro-industriel. Ces collections sont capables d'offrir plus d'une centaine de souches d'une seule et même espèce. Elles représentent ainsi un vivier très intéressant pour la recherche de fonctionnalités d'intérêts dans les domaines de l'agroalimentaire, de la santé et des biotechnologies.

Pour investiguer les capacités de ses ressources microbiennes, le GIS CIRM s'est doté de deux outils de criblage, l'un au CIRM dédié aux Bactéries d'Intérêt Alimentaire (CIRM-BIA) de Rennes, et l'autre au CIRM dédié aux Champignons Filamenteux (CIRM-CF) à Marseille, chaque plateforme étant optimisée pour la manipulation des ressources biologiques lui étant propres.

1 Biodiversité et Biotechnologie Fongiques, Aix-Marseille Université, INRAE, UMR1163, 13288 Marseille, France.

2 INRAE, Aix-Marseille Université, UMR1163, CIRM-CF, 13288 Marseille, France.

3 STLO, INRAE, Agrocampus Ouest, 35000 Rennes, France.

Une plateforme de criblage à haut débit pour la caractérisation phénotypique des souches bactériennes d'intérêt alimentaire au CIRM-BIA de Rennes

Contexte

Le Centre International de Ressources Microbiennes dédié aux Bactéries d'Intérêt Alimentaire (CIRM-BIA), situé à Rennes, possède une collection de plus de 4 000 souches bactériennes issues de collections rapatriées, de dépôts et de collectes ciblées. Si dans les premières années d'activité du CIRM-BIA, les souches de la collection provenaient principalement d'aliments fermentés laitiers, comme le yaourt et les fromages, la collection s'est fortement enrichie ces dernières années avec des souches provenant de matrice d'origine végétale, comme le moût de raisin, le levain de boulangerie ou encore les légumes fermentés.

Les micro-organismes jouent un rôle crucial dans la fermentation des aliments. En fermentant les sucres naturellement présents dans la matrice, différents composés aromatiques sont produits, impactant le goût final de l'aliment. La texture finale de l'aliment peut également être impactée par la production d'exopolysaccharides, par exemple. Enfin, la diminution de pH ayant lieu pendant la fermentation d'une matrice peut empêcher le développement de micro-organismes indésirables tout comme la production de bactériocines.

Ces fonctionnalités très recherchées sont cependant souche-dépendantes et dépendent pour beaucoup de la matrice à fermenter. En effet, une souche produisant des arômes et une texture intéressante sur une matrice laitière n'aura pas forcément les mêmes caractéristiques sur une matrice végétale. À partir de notre expérience, nous avons réalisé que seulement 10 % des souches criblées pouvaient potentiellement montrer un intérêt dans la recherche d'une fonctionnalité ciblée ; cela soulignait l'immense avantage à mettre en place un outil permettant le criblage d'un grand nombre de souches, pour sélectionner rapidement des souches d'intérêt à étudier plus en détails.

Dans ce but, le CIRM-BIA s'est doté, en 2009, d'un automate de criblage à haut débit HAMILTON. Les projets étant très variables, nous avons souhaité une plateforme modulable pour répondre aux questions de recherche très diverses.

Description de la plateforme

Cette plateforme est dotée de 8 canaux (1) et travaille en plaques 96 puits. Un spectrophotomètre est relié au robot

permettant des suivis de croissance par mesure d'absorbance (2). La plateforme est dotée d'une pompe à vide (3) permettant les extractions d'ADNs en haut débit. Elle possède également des blocs chauffants et agitateurs permettant l'incubation de cultures bactériennes liquides en aérobiose sur la plateforme (4, 4'). Différents supports sont présents pour s'adapter aussi bien aux plaques (5), microplaques PCR (6), tubes hémolyse (7), cryotubes (8), eppendorfs (9) ou encore vials CPG (10). Tous les racks sont mobiles et peuvent être déplacés, enlevés ou ajoutés selon le programme. Cette plateforme ainsi équipée est située dans une enceinte stérile.

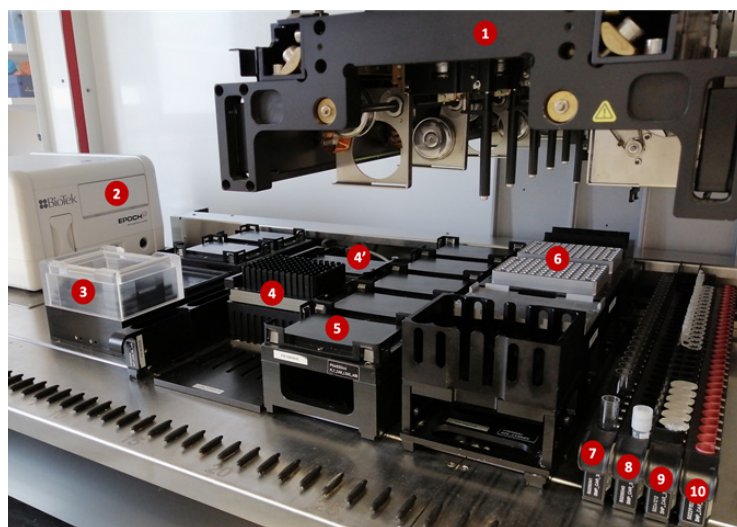


Figure 1. Plateforme de criblage du Centre International de Ressources Microbiennes dédié aux Bactéries d'Intérêt Alimentaires (CIRM-BIA).

Méthodes développées

Si l'outil permet en routine des expérimentations classiques de repiquages de souches, d'extractions d'ADN en plaques 96 puits ou encore de congélation de souches, il est aussi modulable pour permettre le criblage de fonctionnalités recherchées.

Ainsi, de nombreux suivis de croissance ont pu être réalisés, en conditions de cultures optimales ou au contraire en conditions fixées, bas pH, présence de sels, permettant ainsi de cribler les souches sur des critères bien définis.

Ces dernières années, l'outil est très utilisé pour cribler les souches de la collection sur leur capacité à dégrader des sucres d'intérêt dans des milieux synthétiques, des matrices laitières ou encore des matrices végétales. Aujourd'hui ce sont environ 1 000 souches de la collection du CIRM-BIA qui ont déjà pu être testées.

Une plateforme de phénotypage à haut-débit, dédiée à l'exploration fonctionnelle de la biodiversité fongique, au CIRM-CF de Marseille

Contexte

Les champignons filamenteux, principaux micro-organismes impliqués dans la dégradation de la matière organique végétale, sont une source majeure d'enzymes et de molécules d'intérêt biologique dans les domaines de l'agro-alimentaire (arômes, antioxydants, agent de fermentation), de la santé (antiviraux, antimicrobiens, anti-inflammatoires) ou encore des biotechnologies blanches (bioremédiation, biocarburant...). Malgré ce fort potentiel de valorisation, peu d'outils permettent d'explorer la diversité enzymatique et métabolique offerte par les champignons filamenteux, dont la biodiversité est estimée, aujourd'hui, à plus de 5 millions d'espèces. En effet, contrairement à d'autres micro-organismes (bactéries, levures), le développement de méthodes automatisées, adaptées aux champignons filamenteux, et notamment des basidiomycètes, est rendu difficile par des contraintes spécifiques

(cultures hétérogènes, sporulation, pigmentation et viscosité des sécrétomes). C'est dans ce contexte que le CIRM-CF et l'UMR 1163 BBF ont développé, depuis plus de 15 ans, une plateforme de phénotypage à haut-débit, dédiée à l'exploration fonctionnelle de la biodiversité fongique.

Équipements mis en place

Pour répondre aux défis posés par la miniaturisation de culture de champignons filamenteux et par la grande diversité des différents types de champignons filamenteux, nous avons fait le choix d'une plateforme robotisée évolutive, permettant de s'adapter à chaque problématique rencontrée. Aujourd'hui, la plateforme réunit plusieurs équipements autour d'un automate de pipetage TECAN Freedom Evo 200 (Figure 2).

Selon les applications, la plateforme peut utiliser des cônes stériles ou des aiguilles téflonisées pour les pipetages (Figure 2, n°3). Deux manipulateurs de microplaques permettent de déplacer les microplaques aux emplacements requis. Enfin, un ordinateur contrôle l'ensemble de ces équipements.

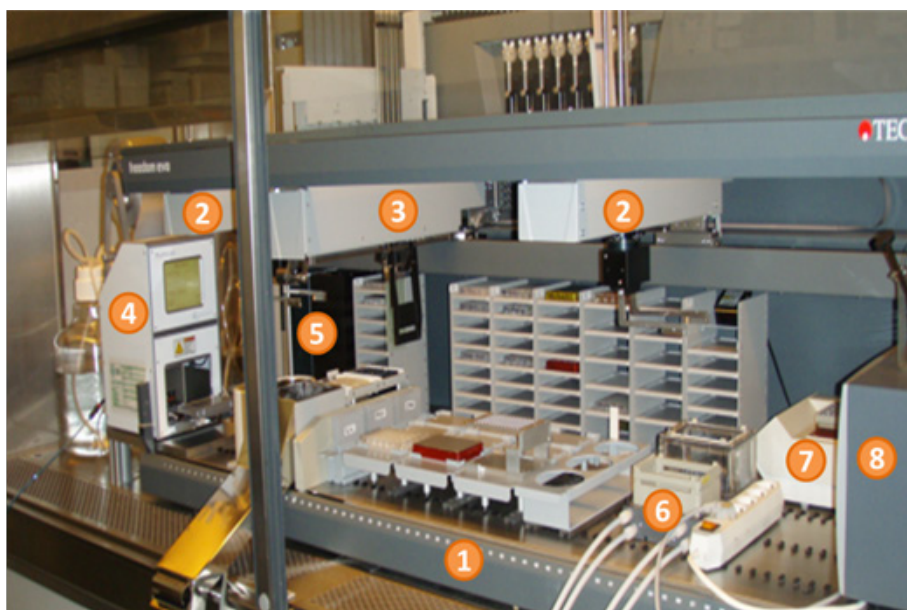


Figure 2. Plateforme de criblage du Centre International de Ressources Microbiennes dédié aux Champignons Filamenteux (CIRM-CF).

- 1) Automate de pipetage TECAN Freedom Evo 200 ;
- 2) Manipulateurs de microplaques ;
- 3) Cônes stériles ou aiguilles téflonisées pour pipetage ;
- 4) Scelleuse de microplaque (VELOCITY11) ;
- 5) Incubateur avec agitation pour microplaque (de 25 à 55 °C) ;
- 6) Unité de filtration de microplaque (TECAN T-Vacs) ;
- 7) Bloc chauffant statique pour microplaque (jusqu'à 100 °C) (EPPENDORF, Thermomixer) ;
- 8) Spectrofluorimètre, avec agitation et incubation (TECAN Infinite 200).

Autour de la plateforme robotisée, d'autres équipements viennent compléter les possibilités :

- Des incubateurs Minitron et Microtron (INFORS) destinés aux cultures moyen-débit (plaques 16 puits) et haut-débit (plaques 24 et 96 puits).
- Une chaîne de chromatographie liquide ultra-haute performance (UHPLC) couplée à un spectromètre de masse (quadrupole simple).



Figure 3. Photos des incubateurs Minitron et Microtron ainsi que de la chaîne de chromatographie liquide ultra-haute performance (UHPLC) couplée à un spectromètre de masse.

Méthodes développées

La plateforme est ouverte à nos partenaires académiques et industriels, ainsi qu'à l'enseignement. Elle a permis le développement de méthodes variées :

- Isolement de lignées monocaryotiques à partir de souches basidiomycètes.
- Criblage et sélection de clones recombinants pour la production d'enzymes en système hétérologue.
- Criblage et sélection de souches pour la production de métabolites ou d'enzymes d'intérêt.
- Phénotypage haut-débit de secrétomes fongiques pour la saccharification de biomasses lignocellulosiques.
- Sélection de souches performantes pour la fermentation en milieu solide.
- Purification haut-débit de protéines recombinantes (His-tag). ■

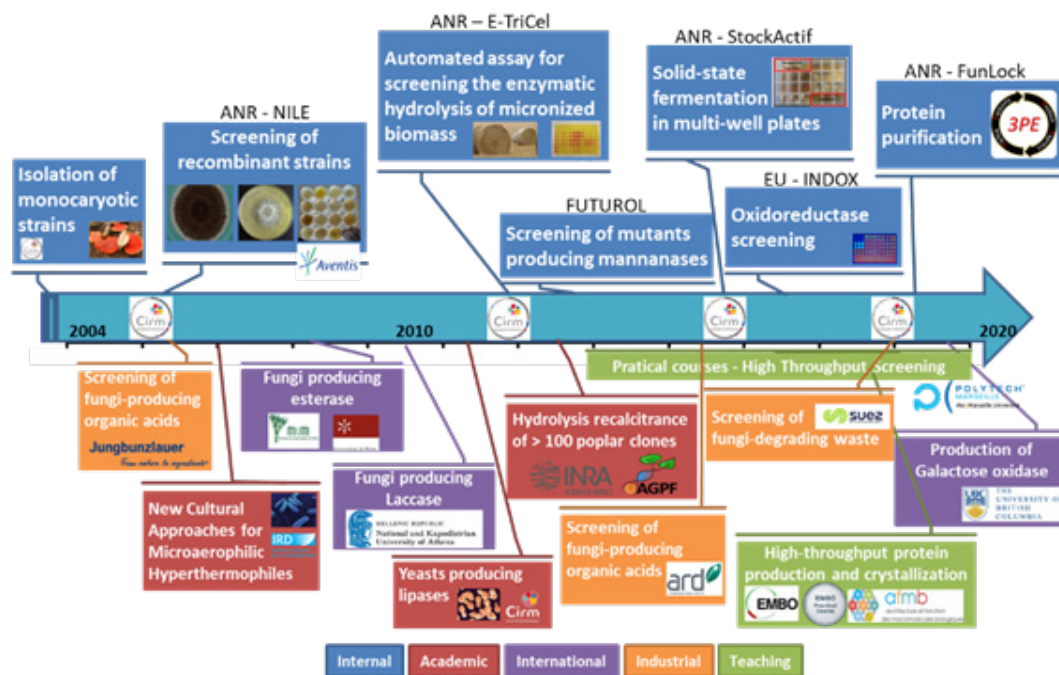


Figure 4. Chronologie des méthodes de criblages développées et des partenariats associés.

Références

- Couturier M., Navarro D., Favel A., Haon M., Lechat C., Lesage-Meessen L., Chevret D., Lombard V., Henrissat B. and Berrin JG. 2016. *Fungal secretomics of ascomycete fungi for biotechnological applications*. Mycosphere. Doi 10.5943/mycosphere/si/3b/6.
- Haon M., Grisel S., Navarro D., Gruet A., Berrin JG. and Bignon C. 2015. *Recombinant protein production facility for fungal biomass-degrading enzymes using the yeast Pichia pastoris*. Frontiers in Microbiology, 23; 6:1002.
- Zhou S., Raouche S., Grisel S., Navarro D., Sigoillot JC. and Herpoël-Gimbert I. 2015. *Solid-state fermentation in multi-well plates to assess pretreatment efficiency of rot fungi on lignocellulose biomass*. Microbial Biotechnology, 8(6):940-9.
- Liaud N., Giniés C., Navarro D., Fabre N., Crapart S., Gimbert I., Levasseur A., Raouche S. and Sigoillot JC. 2014. *Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi*. Fungal Biology and Biotechnology, 1:1.
- Liaud N., Navarro D., Vidal N., Sigoillot JC and Raouche S. 2014. *High throughput automated colorimetric method for the screening of lactic acid producing microorganisms*. MethodsX, 1:e254-e257.
- Berrin JG, Navarro D., Couturier M., Olivé C., Grisel S., Haon M., Taussac S., Lechat C., Courtecuisse R., Favel A., Coutinho P-M. and Lesage-Meessen L. 2012. *Exploring the Natural Fungal Biodiversity of Tropical and Temperate Forests toward Improvement of Biomass Conversion*. Applied and Environmental Microbiology Aug 2012, 78 (18) 6483-6490; DOI: 10.1128/AEM.01651-12.
- Couturier M., Navarro D., Olive C., Chevret D., Haon M., Favel A., Lesage Meessen L., Henrissat B., Coutinho P. M. and Berrin J-G. 2011. *Post-genomic analyses of fungal lignocellulosic biomass degradation reveal the unexpected potential of the plant pathogen Ustilago maydis*. BMC Genomics 2012, 13:57/1471-2164.
- Uzarraga R., Auria R., Davidson S., Navarro D., and Combet-Blanc Y. 2010. *New Cultural Approaches for Microaerophilic Hyperthermophiles*. Current Microbiology, Volume 62, Number 2, 346-350.
- Navarro D, Couturier M, da Silva GG, Berrin JG, Rouau X, Asther M, Bignon C. 2010. *Automated assay for screening the enzymatic release of reducing sugars from micronized biomass*. Microbial Cell Factories. 2010 Jul 16;9:58.
- Alberto F., Navarro D., De Vries RP., Asther M. and Record E. 2009. *Technical advance in fungal biotechnology: development of miniaturized culture method and an automated high-throughput screening*. Letters in Applied Microbiology, 49, no2, pp. 278-282.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

FOCUS

Le Centre ARCAD à Montpellier : conserver l'agrobiodiversité pour adapter les cultures aux changements climatiques et aux nouvelles pratiques agricoles

Jean-Marie PROSPERI¹

CORRESPONDANCE

jean-marie.prospери@inrae.fr

Le 6 octobre 2021, l'INRAE, le CIRAD, l'IRD et l'institut Agro ont inauguré un centre de niveau mondial dédié à la conservation et à l'étude des ressources génétiques des plantes cultivées méditerranéennes et tropicales : ARCAD (Agropolis Resource Centre for Crop Conservation, Adaptation and Diversity).

Hébergé par l'INRAE, le Centre ARCAD rassemble les principales collections de ressources génétiques végétales du Cirad, de l'IRD et d'Inrae sur Montpellier. Cinquante mille échantillons (Maïs, Medicago, Sorgho, Blé dur, Riz, Mil, Coton, Fonio, Arachide, mais aussi Vigne, Cacao, Café, Arbres forestiers...) y sont conservés sous forme de graines, de plantes *in vitro* ou au sein de Centres de ressources génétiques partenaires. Focus sur la Première « banque » française de conservation de plantes cultivées.



¹ UMR AGAP, Équipe Ge2Pop, INRAE.

L'infrastructure ARCAD

Le bâtiment ARCAD est construit en forme de H avec, en son cœur, un robot transstockeur unique en Europe. Autour du plateau de conservation des graines (CRB Gamet), se déploient trois autres plateaux techniques : Génotypage et Séquençage, Phénotypage des semences et Cryoconservation.

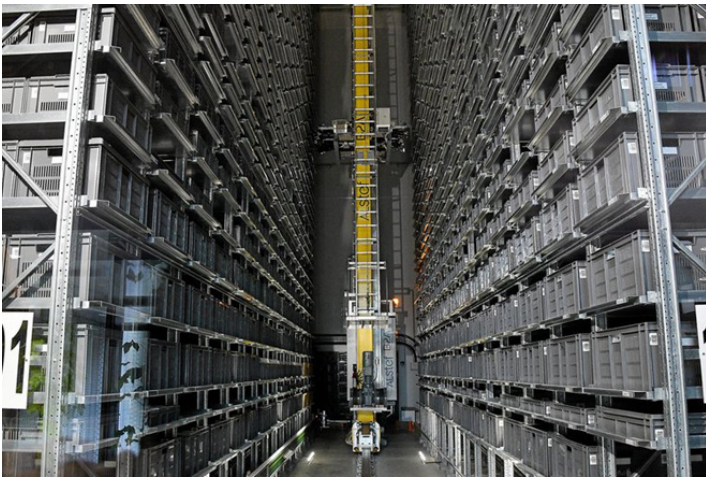


Figure 1. Transstockeur

- **Le Centre de Ressources biologiques (CRB) Gamet** est issu de la fusion du CRB Tropicales du Cirad et des CRB Maïs et Medicago d'Inrae. Installé au sein du bâtiment ARCAD, le CRB Gamet assure la caractérisation initiale permettant de valider l'état et le statut des accessions reçues, ainsi que leur conservation et diffusion. Les accessions sont conservées à +4 °C et 25 % d'hygrométrie dans une chambre froide robotisée de 600 m³ ; des lots de sauvegarde sont placés en congélateurs à -18 °C ou cryo-conservés. Des tests de germination sont réalisés régulièrement et les conditions de conservation sont contrôlées afin de s'assurer de leur stabilité. Pour renouveler les lots, dont la faculté de germination est basse ou dont la quantité en stock est inférieure à un seuil prédéterminé, des campagnes de multiplication sont organisées en serres ou aux champs, en Métropole ou en Guadeloupe. Labellisé IBISA (Infrastructures en Biologie, Santé et Agronomie), en mars 2009, sous la dénomination Centre de ressources biologiques tropicales de Montpellier (CRB-T), le CRB Gamet est certifié NFS 96-900 « Qualité des centres de ressources biologiques » depuis septembre 2011.

- **Le plateau de génotypage et de séquençage** est spécialisé dans la mise en œuvre de la biologie moléculaire à haut débit au service de l'analyse génétique de la bio-

diversité végétale et en soutien à l'exploitation des ressources génétiques dans les programmes d'amélioration des plantes. Localisé sur deux sites distants de moins de 800 mètres, le plateau offre plus de 600 m² de laboratoires équipés des dernières technologies : 2 séquenceurs capillaires, 2 séquenceurs NGS de paillasse, 2 séquenceurs sur gel, 3 Machines de PCR quantitative, des thermocycleurs 96 et 384 puits, des robots variés dédiés aux extractions d'acides nucléiques, à la préparation de PCR et à la création de ressources génomiques. Inséré au sein du réseau Montpellier Génomix, le plateau a accès à de nombreux outils et équipements à très haut débit : séquençage NGS, transcriptomique, bio-informatique, bio-statistiques.

- **Le plateau de phénotypage des semences** regroupe, aux côtés d'équipements éprouvés (compteurs de grains, loupes binoculaires, balances, tamis ...), des équipements novateurs et des prototypes développés spécifiquement pour ce plateau. Ces matériels permettent de mesurer et de caractériser les graines sèches (morphométrie), leur qualité biochimique (composition chimique, structure physique) et leur faculté germinative. L'idée qui prévalait autour de la mise en place de ce plateau était d'utiliser des techniques nouvelles, comme la robotisation, l'analyse automatique d'images et la spectrométrie proche infra-rouge. Ces technologies, déjà largement éprouvées dans d'autres secteurs, permettent des gains importants de productivité, de fiabilité et de qualité des données obtenues. Sont notamment présents sur ce plateau : un banc automatique de suivi et de caractérisation de la dynamique de la germination des semences par analyse d'images ; trois appareils de mesure des semences par analyse d'images permettant d'accéder à la valeur moyenne des lots, mais aussi à leur variance ; deux trieurs expérimentaux de laboratoire, l'un sur la base de la forme et de la couleur des graines, le



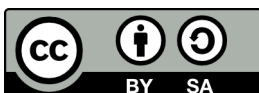
Figure 2. Automate de germination

second sur leur spectre d'absorbance. Spécialement axé sur les besoins des Centres de Ressources Biologiques, ce plateau couvre une très large gamme d'espèces agricoles ou apparentées ; il est aussi à la disposition des équipes de recherche partenaires.

- **La cryoconservation** (conservation dans l'azote liquide à -196 °C) est la seule technique qui permet d'assurer une conservation à très long terme, sûre et pour un coût réduit de toutes les ressources biologiques. Elle permet notamment de conserver les plantes multipliées végétativement (vigne, arbres fruitiers, plantes à tubercules), les plantes qui ne produisent pas de graines (comme les bananiers ou les ananas cultivés) ou les plantes qui produisent des graines sensibles à la déshydratation, dites semences non-orthodoxes (caféiers, agrumes, palmiers, cacaoyers ou hévéa). La cryoconservation peut aussi être employée pour la conservation à long terme des graines orthodoxes conservées conventionnellement en chambre froide, notamment pour les espèces oléagineuses dont la longévité reste faible à +4 °C. Le plateau de cryoconservation, localisé sur deux sites (IRD et Inrae), offre à la fois des équipements spécifiques (congélateurs programmables, enceintes thermostatées, cryotanks) et des moyens de culture *in vitro* performants. Il permet de développer et de valider des protocoles spécifiques de cryoconservation, mais assure aussi la conservation long terme des doubles de sécurité de collections importantes, comme la vigne, le café ou la banane.

Par-delà les murs du bâtiment, ARCAD est aussi **un centre de convergence et d'échanges de recherches, d'expertises et d'expériences** qui cherchent à comprendre comment les contraintes physiques, l'environnement biologique et les sociétés humaines façonnent la diversité des plantes cultivées. Ces connaissances et données viennent irriguer la gestion et la mobilisation de la diversité des plantes cultivées afin de répondre aux enjeux des grandes transitions en cours et à venir : transitions agro-écologique, climatique et sociétale. Les recherches menées au sein d'ARCAD portent notamment sur la domestication et l'histoire évolutive des plantes, l'adaptation au changement climatique et la gestion, par les agriculteurs, de la diversité des espèces et des variétés cultivées. Ces recherches mobilisent des disciplines variées : génomique, bio-informatique, génétique des populations, botanique, mais aussi anthropologie et sciences politiques. Les connaissances et les méthodologies développées sur ces thèmes sont valorisées grâce à une offre de formation déclinée sous forme d'ateliers pédagogiques, de modules de formation et d'écoles thématiques internationales. ■

Lien : <https://www.inrae.fr/actualites/conserver-lagrobiodiversite-adapter-cultures-aux-changements-climatiques-inauguration-deux-infrastructures-majeures-montpellier>



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF : un outil de diagnostic pour l'identification et le typage des bactéries pathogènes des poissons

Eric DUCHAUD¹

CORRESPONDANCE

eric.duchaud@inrae.fr

RÉSUMÉ

Les méthodes d'identification des bactéries responsables d'épisodes infectieux chez les poissons reposent encore essentiellement sur des techniques traditionnelles, pas toujours discriminantes, comme l'histologie, la cytologie, la recherche de caractères phénotypiques et le sérotypage. Des méthodes moléculaires modernes (e.g., MLST, WGS) tendent à se substituer à ces approches classiques, mais restent le plus souvent, de par leur coût, leur débit et le temps requis, utilisées pour des études rétrospectives dans le cadre de travaux académiques. Pour adapter les traitements et prendre les mesures visant à contrôler un épisode infectieux, les aquaculteurs et les différentes parties prenantes (e.g., vétérinaires, Groupements de Défense Sanitaire Aquacole) ont besoin d'un diagnostic précis, rapide et, idéalement, peu onéreux de l'agent causal. La spectrométrie de masse à temps de vol par désorption laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS) est une technique d'identification bactérienne largement répandue dans les laboratoires d'analyses de microbiologie médicale, qui tend à s'étendre aux laboratoires de diagnostic vétérinaire. Basée sur l'analyse directe de cultures bactériennes, la technique MALDI-TOF MS génère un spectre protéique qui est ensuite comparé à un ensemble de spectres de référence stockés dans une base de données. C'est une technique rapide, bon marché et qui se prête bien aux analyses à haut-débit. Cependant, les bases de données commerciales MALDI-TOF MS ne contiennent que peu d'espèces de bactéries pathogènes des poissons. D'autre part, l'identification est insuffisante pour répondre à des questions relevant de l'épidémiologie, dont la base est la caractérisation fine (typage) des isolats bactériens. Nous avons développé un schéma MALDI-TOF MS d'identification pour les espèces du genre *Tenacibaculum* et amélioré ses performances pour son utilisation comme outil épidémiologique de première ligne pour l'espèce *T. maritimum*, un redoutable agent pathogène des poissons marins. Cet article intègre des conseils issus de cette expérience et de recherches bibliographiques, afin de guider le lecteur pour le développement d'une telle approche.

MOTS-CLÉS

Diagnostic, bactéries pathogènes des poissons, identification, typage, MALDI-TOF MS.

¹ Unité Virologie et Immunologie Moléculaires, INRAE, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France.

MALDI-TOF mass spectrometry: a diagnostic tool for identifying and typing fish pathogenic bacteria

Eric DUCHAUD¹

CORRESPONDENCE

eric.duchaud@inrae.fr

ABSTRACT

Methods used to identify the bacteria responsible for outbreaks of infectious diseases in fish farms still essentially rely on traditional and usually non-discriminatory techniques, such as histology, cytology, phenotypic characteristics and serotyping. Modern molecular methods (e.g., MLST, WGS) tend to replace these classical approaches but are usually employed for retrospective studies within the framework of academic research due to their cost, throughput and the time required. To adapt treatments and take control measures, fish farmers and stakeholders (e.g., aquaculture veterinarians) need an accurate, rapid and, ideally, inexpensive diagnosis of the causative agent. Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a bacterial identification technique widely used in medical microbiology laboratories that is progressively spreading to veterinary diagnostic laboratories. Based on the direct analysis of bacterial cultures, MALDI-TOF MS generates a protein spectrum which is then compared to a set of reference spectra stored in a database. It is a fast, inexpensive technique well-adapted to high-throughput analyses. However, commercial MALDI-TOF MS databases contain only a limited number of bacterial fish pathogens. On the other hand, identification is insufficient to answer questions related to epidemiology, the basis of which is the fine characterization (typing) of bacterial isolates. We have developed a MALDI-TOF MS identification method for species of the genus *Tenacibaculum* and improved its performance for use as a first-line epidemiological tool for the species *T. maritimum*, a devastating pathogen of marine fish. This technical notebook includes advice resulting from this experiment and bibliographic research to guide the reader in developing such an approach.

KEYWORDS

Diagnostics, fish bacterial pathogens, identification, typing, MALDI-TOF MS.

¹ Unité Virologie et Immunologie Moléculaires, INRAE, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France.

Introduction

L'aquaculture est le secteur de production alimentaire qui connaît la croissance la plus rapide (d'environ 8 % par an depuis plusieurs décennies) et joue un rôle de plus en plus critique dans la sécurité alimentaire mondiale (FAO, 2020). La consommation de poissons d'élevage dépasse désormais celle de poissons issus de capture. L'aquaculture moderne implique donc des techniques de production massive, à l'image des élevages d'animaux terrestres. Ceci n'est pas sans conséquences, notamment en termes de développement de maladies. Les niveaux actuels de survie des poissons d'élevage, de l'éclosion jusqu'à la taille commerciale, sont de seulement 20 % en moyenne, et les experts estiment que les pertes mondiales de production dues aux maladies excèdent couramment 10 % (soit 6 milliards de dollars de pertes en 2014), ce qui en fait le défi majeur au développement de l'aquaculture (World Bank, 2014).

Le genre *Tenacibaculum* (famille des *Flavobacteriaceae*, phylum *Bacteroidetes*) comprend 32 espèces dont les noms ont été officiellement publiés (LPSN²), et dont au moins huit (*T. maritimum*, *T. discolor*, *T. soleae*, *T. dicentrarchi*, *T. gallaicum*, *T. finnmarkense*, *T. ovolyticum* et *T. piscium*) ont été signalées comme pathogènes des poissons marins, affectant une large gamme de poissons d'élevage à grande valeur ajoutée (e.g., saumon, bar, turbot, sole) avec une très large répartition géographique. Ces espèces sont responsables d'une maladie ulcéreuse (Figure 1) dénommée ténacibaculose (également connue sous le nom de flexibactériose) et associée à de graves épisodes infectieux conduisant à des pertes économiques importantes (Nowlan JP *et al.*, 2020). La plupart, sinon la totalité, des pays impliqués dans la production de poissons marins ont connu de graves flambées de ténacibaculose, récemment identifiée dans le projet MedAID H2020 comme la deuxième maladie la plus importante du bar dans les fermes piscicoles méditerranéennes (Muniesa *et al.*, 2020). À ce jour il n'existe pas de vaccins commerciaux, et les traitements reposent exclusivement sur des traitements antibiotiques ou l'utilisation de désinfectants chimiques.



Figure 1. Jeune bar (*Dicentrarchus labrax*) atteint de ténacibaculose et présentant une atteinte sur le flanc.

Dans la plupart des cas (y compris ceux de la littérature scientifique), l'isolement et l'identification bactérienne ne sont pas effectués et le diagnostic de ténacibaculose est uniquement basé sur les symptômes cliniques et des observations microscopiques des lésions. En effet, l'identification correcte des espèces impliquées dans la ténacibaculose est entravée par une combinaison de facteurs, en particulier la découverte récente d'une diversité insoupçonnée d'espèces pathogènes du genre *Tenacibaculum* qui n'a pas été suivie du développement des outils de diagnostic correspondants (Nowlan *et al.*, 2020).

Les méthodes modernes de typage bactérien reposent essentiellement sur des techniques moléculaires [e.g., séquençage de gènes multiples (MLST) ou du génome complet (WGS)] qui nécessitent du temps, une certaine technicité, ont un coût élevé, ne sont pas facilement automatisables et sont donc rarement applicables à du typage bactérien de routine. Le MALDI-TOF MS présentant bon nombre de ces qualités, il a donc été testé pour typer quelques bactéries, essentiellement pathogènes pour l'homme, comme *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ou encore *Listeria monocytogenes*.

Outil innovant facile à utiliser, rapide, précis, bon marché et qui se prête bien à l'analyse à haut-débit, la spectrométrie de masse MALDI-TOF a ainsi révolutionné l'identification bactérienne dans les laboratoires de microbiologie médicale (Carbannelle & Nassif, 2011). Permettant d'identifier les micro-organismes au niveau de l'espèce par l'analyse des protéines totales (Croxatto *et al.*, 2012), cette technique

² LPSN - <https://lpsn.dsmz.de/search?word=tenacibaculum>, consulté le 20-01-2021.

est basée sur la génération de spectres de masse à partir de cellules entières (ou après extraction des protéines totales) et de leur comparaison à des listes de spectres de référence. Une fois les échantillons prêts, l'identification des espèces prend seulement quelques minutes. C'est ainsi que le MALDI-TOF MS a été intégré, au cours de la dernière décennie, dans les pipelines d'analyse de routine des laboratoires de microbiologie médicale pour l'identification microbienne, remplaçant les techniques biochimiques ou moléculaires traditionnelles. Cette technique trouve aussi de plus en plus sa place dans les laboratoires d'analyses vétérinaires.

Actuellement, le MALDI-TOF MS et les bases de données commerciales sont essentiellement focalisés sur l'identification taxonomique au niveau de l'espèce. Toutefois, la population d'individus constituant une espèce bactérienne est loin d'être homogène. Par conséquent, les espèces d'importance clinique sont subdivisées en groupes différents, par exemple, par leur degré de virulence, leur spectre d'hôte ou leur capacité de dissémination. Le but du typage bactérien est donc de discriminer des groupes de souches parmi d'autres et de comparer les isolats pour suivre la propagation de groupes spécifiques (e.g., clones épidémiques hautement virulents, cas sporadiques de moindre virulence) (Riley & Blanton, 2018). Le typage bactérien peut être utilisé pour réaliser des études épidémiologiques rétrospectives dans des laboratoires de recherche académique ou en routine dans des laboratoires d'analyses médicales, telle l'identification de clones épidémiques nécessitant la mise en œuvre rapide de mesures de contrôle. Par ailleurs, un des attraits du MALDI-TOF MS est que les spectres générés peuvent contenir beaucoup plus d'informations qu'il n'en faut pour l'identification des espèces bactériennes et qu'ils peuvent donc être utilisés à des fins de typage. Malheureusement, il ne semble pas possible d'établir un schéma universel de typage pour l'ensemble des espèces bactériennes, mais seulement des règles générales sur la manière d'établir et de valider un schéma (Spinali *et al.*, 2015). Il faut également souligner que la résolution du MALDI-TOF MS a certainement des limites et qu'il n'y a aucune garantie que les objectifs soient atteints (Kang *et al.*, 2017). Enfin, ceux qui cherchent à utiliser le MALDI-TOF MS pour effectuer du typage en routine ne peuvent probablement pas éviter d'analyser un grand

nombre de souches bien caractérisées et d'évaluer avec précision la valeur prédictive de leur schéma.

Bien que présentant de nombreux avantages, cette méthode nécessite des développements en vue d'une application en aquaculture. En effet, elle ne peut qu'identifier les espèces bactériennes pour lesquelles des spectres de référence préétablis sont présents dans les bases de données. Cette limite s'impose pour les nombreuses espèces pathogènes des poissons, pour la plupart absentes des collections de spectres fournies par les fabricants de spectromètres MALDI-TOF.

Cet article présente la stratégie mise en place pour identifier, par MALDI-TOF MS, les bactéries du genre *Tenacibaculum* et évaluer son potentiel pour le typage d'isolats appartenant à l'espèce *T. maritimum*. Ce retour d'expérience devrait permettre de guider le lecteur pour le développement d'une démarche similaire pour des espèces bactériennes intéressantes dans son domaine de recherche.

MALDI-TOF MS : principe de fonctionnement

Il existe une très riche bibliographie sur le principe de fonctionnement du MALDI TOF-MS et cet article n'a pas vocation à le détailler (pour des revues, voir Singhal *et al.*, 2015 et Wieser *et al.*, 2012). Brièvement, un spectromètre MALDI TOF est composé de trois unités : (1) une source d'ions (MALDI), (2) un dispositif permettant de séparer les ions selon leur rapport masse / charge (m/z) (TOF) et (3) un système de détection des ions. Dans le cas qui nous intéresse, l'échantillon analysé, ou analyte, se compose généralement de bactéries entières (d'extraits protéiques totaux) mélangées à une matrice favorisant l'ionisation, et les ions générés correspondent aux protéines bactériennes intactes ionisées. Les ions formés et détectés sont ceux chargés positivement (majoritairement de charge +1, c'est-à-dire ayant capté un proton). Ils sont accélérés sous l'action d'un champ électrique, puis passent dans un tube de vol. Dans ce tube, à charge égale (e.g., $z = +1$), ceux de petite masse sont les plus rapides, ceux de grosse masse sont les plus lents. Il existe une relation de proportionnalité entre la masse d'une protéine et son temps de vol (le TOF pour « time of flight »). C'est donc du temps de vol qu'est déduite la masse de chaque particule atteignant le détecteur. L'ensemble des ions détectés

va former un spectre caractéristique de l'échantillon analysé. Les appareils MALDI TOF-MS commerciaux dédiés à l'identification bactérienne sont capables de détecter des molécules de 20 à 20 000 m/z (ou Da pour tous ceux, majoritaires, de charge +1). Environ 50 % des protéines identifiées dans ces spectres MALDI-TOF sont des protéines ribosomiques, car elles sont majoritaires dans les cellules en croissance. La plupart d'entre elles ont un faible poids moléculaire, compatible avec la gamme de masse observable en MALDI-TOF, et elles possèdent également un p*K*i élevé, supérieur à 8, les rendant plus sensibles à l'ionisation (Ryzhov & Fenselau, 2001). Nous reviendrons ultérieurement sur ce point.

On représente classiquement le spectre d'un échantillon par un graphique avec, sur l'axe des abscisses, le rapport m/z et, sur l'axe des ordonnées, l'intensité du signal, c'est-à-dire le nombre total de chaque ion particulier détecté (Figure 2). Une fois le spectre d'un échantillon acquis, des logiciels permettent de comparer l'empreinte spectrale obtenue à toutes celles contenues dans une base de données.

La fiabilité et la précision du MALDI-TOF MS ont été vérifiées dans un certain nombre d'études ; les résultats d'identification obtenus reposent, pour une bonne partie, sur le nombre d'entrées de la banque de données utilisée (Singhal *et al.*, 2015 ; Hou *et al.*, 2019). À ce stade, les banques de données commerciales (ou bibliothèques de référence) contiennent essentiellement des spectres issus de micro-organismes d'intérêt clinique et peu de bactéries « exotiques », ce qui est le cas pour bon nombre d'espèces pathogènes des poissons.

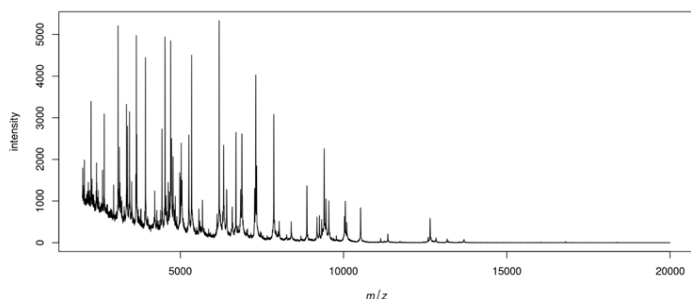


Figure 2. Exemple de spectre MALDI-TOF MS obtenu à partir de colonies entières de *Tenacibaculum maritimum*, suivi d'une étape d'extraction protéique par éthanol/acide formique. La matrice utilisée est l'acide -cyano-4-hydroxycinnamique.

Création d'une bibliothèque de spectres de référence à façon

Il est heureusement possible de créer sa propre librairie de spectres de référence et de l'intégrer à une base de données commerciale (e.g., Bruker's MALDI Biotyper) ou à sa propre base de données. Comme il existe nombre de logiciels libres permettant de s'affranchir des outils commerciaux, nous avons choisi d'utiliser les outils MALDIquant, MALDIquant Foreign, et MALDIrppa (Gibb & Strimmer, 2012 ; Palarea-Albaladejo *et al.*, 2018) utilisant des scripts R. Comme évoqué précédemment, les résultats d'analyse MALDI-TOF MS d'un échantillon étant tributaires de la qualité de la banque de données (et dans une certaine mesure des logiciels d'analyse utilisés), la réalisation de cette (ou de ces) banque(s) est un prérequis nécessitant une attention particulière. Les souches types (celles à l'origine de la description de l'espèce) étant d'une importance fondamentale en systématique bactérienne, il nous est apparu indispensable d'intégrer celles de toutes les espèces du genre *Tenacibaculum* (LPSN). De plus, pour avoir une meilleure estimation de la variabilité des spectres obtenus, il nous semblait pertinent de générer plusieurs spectres de référence pour chaque espèce bactérienne particulièrement ciblée. Pour ce faire, il est nécessaire de sélectionner quelques souches représentatives de l'espèce bien caractérisées et de générer leurs spectres dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les souches types. Pour réaliser ces spectres de référence, chaque souche type et chaque souche de référence est cultivée en triplicatas (trois répliques biologiques). Pour chaque réplique, 12 spectres sont enregistrés (4 dépôts indépendants sur la cible MALDI (répliques techniques) et 3 spectres acquis par dépôt). Il y a donc, en tout, 36 spectres pour chacune de ces souches. Après les contrôles qualité classiques, les spectres de bonne qualité retenus (24 spectres minimum) sont agrégés pour construire un spectre de référence moyen pour chaque souche.

De l'intérêt de la génomique

Si l'utilisation du séquençage complet du génome (WGS) est encore difficilement envisageable pour effectuer du diagnostic de routine, en particulier sur un très grand nombre d'échantillons, il trouve, en

revanche, toute sa place pour caractériser finement les souches de référence. Cette stratégie permet de confirmer l'appartenance d'une souche à une espèce bactérienne (en utilisant par exemple des métriques basées sur l'identité nucléotidique moyenne ou ANI) et de préciser les positions taxonomiques des espèces les unes par rapport aux autres (e.g., phylogénies réalisées sur l'ensemble des gènes partagés entre souches ou génome central dans le taxon considéré). Ce travail permet également d'inclure ou d'exclure des souches pour générer les spectres de référence avec objectivité.

Dans le cadre du travail que nous avons réalisé sur les bactéries du genre *Tenacibaculum*, cette stratégie nous a permis i) d'infirmer l'existence de l'espèce *T. ascidiaceicola*, dont la souche type de cette espèce partage >98 % d'identité de séquence génomique avec l'espèce *T. discolor* (il aurait donc été compliqué de discriminer par MALDI-TOF MS une espèce qui n'en est pas une !); ii) de décrire la nouvelle espèce *T. piscium* (Olsen *et al.*, 2020); et iii) de confirmer l'identité taxonomique des souches intégrées dans notre stratégie pour réaliser la banque de spectres de référence.

L'obtention de génomes complets pour les espèces du genre *Tenacibaculum* nous a également permis de mettre en évidence l'implication de plusieurs espèces pathogènes des poissons étroitement apparentées (*T. dicentrarchi*, *T. finnmarkense* et *T. piscium*) dans des cas de tenacibaculose initialement attribués à *T. maritimum* (Bridel *et al.*, 2018; Olsen *et al.*, 2020). Ce résultat laissait, par ailleurs, entrevoir qu'il serait difficile de les discriminer par une approche classique, utilisant les spectres MALDI-TOF MS complets.

Enfin, comme évoqué précédemment, les spectres MALDI-TOF sont essentiellement constitués de protéines ribosomiques. Il est donc possible d'obtenir la séquence de ces protéines à partir des génomes afin d'y chercher des ressemblances et des différences. Cette approche visant à identifier des biomarqueurs permet de confirmer l'identification obtenue avec le spectre complet et de proposer un schéma de typage, du moins si du polymorphisme existe pour certains biomarqueurs.

À la recherche de biomarqueurs

Si l'identification d'une espèce bactérienne par MALDI-TOF MS semble ne pas poser de grandes difficultés - sous réserve que la base de données interrogée soit complète et que les espèces considérées soient suffisamment distinctes les unes des autres -, il n'en est pas de même pour le typage bactérien. Un spectre MALDI-TOF MS contient généralement une centaine de pics, tout ou partie d'entre eux pouvant être utilisés pour du typage. Ce dernier peut donc soit exploiter le spectre entier, soit un sous-ensemble de pics ou encore un pic unique. Cependant, la capacité du MALDI-TOF MS à typer les souches dépend des caractéristiques intrinsèques de l'espèce bactérienne considérée. Il serait difficile, voire impossible, de capturer un polymorphisme suffisant pour des espèces très homogènes et présentant peu de diversité génétique, ou plus exactement protéique. Il n'est donc pas possible d'établir un schéma universel de typage, mais on peut s'appuyer sur des règles générales (Spinalli *et al.*, 2015; Sauget *et al.*, 2017) de manière à développer et à valider un schéma pour les espèces que l'on souhaite étudier.

Les données MALDI-TOF MS contiennent trois types d'informations : l'intensité du signal, la perte (et le gain) de signal et le *peak shift* (décalage du signal). Une variation d'intensité du signal peut être due à une modification d'expression de la protéine correspondante, liée aux conditions de culture, à l'âge de la colonie prélevée, etc. Une perte (ou un gain) de signal peut survenir en raison de l'absence (ou de la présence) d'un gène dans une souche donnée, mais également du mode de préparation de l'échantillon ou des conditions de culture. Ainsi, la variation d'intensité et l'apparition/disparition de pics donnent une information ambiguë sur le génotype d'un isolat. En revanche, un décalage de pic est la conséquence directe d'une modification de la séquence en acides aminés (polymorphisme) de la protéine correspondante. Ces modifications de composition en acides aminés d'une protéine se matérialisent par un changement de masse entraînant un décalage, en amont ou en aval, du pic théoriquement attendu pour la protéine correspondante. Avec la sensibilité des appareils MALDI-TOF MS, le changement d'un seul acide aminé est souvent suffisant pour observer dans les spectres un *peak shift*. Ils sont donc de

très bons candidats utilisables comme biomarqueurs pour effectuer un typage bactérien.

Sachant qu'environ 50 % des pics détectés dans un spectre MALDI-TOF MS correspondent à des protéines ribosomiques, il est relativement aisé d'identifier, à partir des génomes complets, des protéines ribosomiques présentant du polymorphisme susceptible d'entraîner un *peak shift*. On peut alors déduire les masses théoriques de ces isoformes protéiques et rechercher dans les spectres MALDI-TOF MS leurs positions relatives.

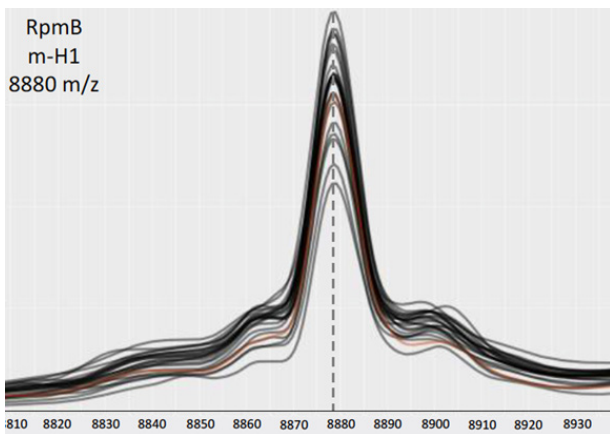
Nous avons effectué ce travail pour l'espèce *Tenacibaculum maritimum*. C'est l'espèce type du genre *Tenacibaculum*, sans doute celle la plus répandue dans les élevages et dont le plus grand nombre d'isolats était disponible. Nous avons donc sélectionné 24 souches dans la collection du laboratoire en les choisissant les plus diverses possibles (année d'isolement, origine géographique et poisson hôte). Nous avons séquencé les génomes de ces souches et réalisé en parallèle leurs spectres MALDI-TOF MS de référence. À partir des séquences obtenues, nous avons tout d'abord réalisé les vérifications d'appartenance à l'espèce (ANI, phylogénies utilisant le génome central...) et extrait les séquences déduites des protéines ribosomiques. Il était alors possible de les comparer et d'identifier celles ne présentant pas de polymorphisme (protéines ribosomiques monomorphes) et celles présentant des variations de séquence (protéines ribosomiques polymorphes). Les premières étaient de bonnes candidates biomarqueurs pour valider l'appartenance à l'espèce *T. maritimum* lors de l'identification des souches par MALDI-TOF MS. D'autre part, elles pouvaient servir de calibration interne pour l'ensemble du spectre obtenu. Les protéines ribosomiques polymorphes, quant à elles, devaient logiquement laisser apparaître un décalage de pic dans les spectres MALDI-TOF MS, et représentaient de bonnes candidates biomarqueurs pour développer une méthode de typage.

Utiliser une combinaison de biomarqueurs pour le typage : développement d'une stratégie *Multi peak shift typing* (MPST)

Pour l'ensemble des protéines ribosomiques identifiées *in silico*, nous avons calculé les masses prédites (en prenant soin de conserver ou d'enlever la pre-

mière méthionine selon les résultats de prédiction obtenus par le logiciel « Terminator ») et recherché dans les spectres les pics correspondants. Nous avons retenu uniquement ceux présentant les critères stricts suivants : i) ils se situent dans la partie du spectre la plus discriminante (de 3 000 à 13 000 m/z) ; ii) ils correspondent aux masses des protéines ribosomiques prédites *in silico* avec une faible tolérance d'erreur (300 ppm) ; iii) ils sont présents dans tous les spectres MALDI-TOF des 24 isolats de référence ; iv) la plupart d'entre eux sont de haute intensité, même aux deux extrémités du spectre (bien que l'intensité soit globalement plus faible dans ces régions) ; v) ils ne sont pas perturbés par la présence d'autres pics très proches qui pourraient dégrader la fiabilité de détection des pics (en d'autres termes, les pics retenus devaient se trouver dans une fenêtre dépourvue de pics supplémentaires) ; et vi) pour les protéines polymorphes, nous avons privilégié les pics correspondant à des protéines monochargées (+1H). Ce travail nous a permis d'identifier 18 pics (soit 9 protéines différentes, certaines apparaissant en écho en fonction du nombre de charge +1H, +2H ou +3H) correspondant à des protéines ribosomiques monomorphes et 9 pics correspondant à des protéines ribosomiques polymorphes (Figure 3). Ces dernières présentaient de 2 à 5 isoformes différentes et ont servi à développer une stratégie de *Multi peak shift typing* (MPST). Nous avons, en effet, raisonné par analogie avec la stratégie de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) qui repose sur une combinaison de marqueurs correspondant à des séquences nucléiques, généralement des 7 gènes suffisamment conservés dans une espèce, mais présentant un certain polymorphisme permettant de discriminer les souches entre elles. Nous avons donc codé de manière arbitraire (1, 2, 3...) les différentes isoformes des protéines polymorphes retenues (à la manière des *allele type* ou AT dans l'approche MLST) et les avons agrégées : le résultat ou MALDI-type correspond à la combinaison unique d'isoformes pour chacun des 9 biomarqueurs présents dans une souche donnée (à la manière des *sequence type* ou ST correspondant à une combinaison unique d'ATs dans l'approche MLST). Cette stratégie originale permettait, par ailleurs, d'utiliser, dans le cadre des données MALDI-TOF MS, les outils informatiques (eBURST, Split tree) développés à l'origine pour re-

A)



B)

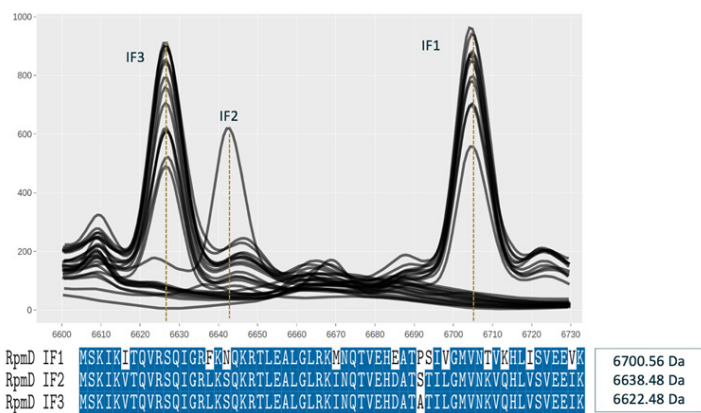


Figure 3. Exemple de pics correspondant à des protéines ribosomiques de *Tenacibaculum maritimum* observées dans les spectres MALDI-TOF MS. A) protéine RpmB, monomorphe monochargée (masse prédite 8880 Da après retranchement de la méthionine en N-terminal). B) Alignement des trois isoformes (IF1, IF2 et IF3) de la protéine polymorphe RpmD à partir des séquences extraites de 24 génomes représentatifs de l'espèce *T. maritimum* (les masses prédites sont indiquées) et pics correspondant à ces trois isoformes, identifiés dans les spectres MALDI-TOF MS obtenus à partir des mêmes souches.

présenter les données MLST. Ces outils ont permis de visualiser les liens, dont ceux issus de la recombinaison, entre souches et de les regrouper en complexe clonaux (CC).

À partir des données MALDI-TOF MS obtenues sur 131 isolats de terrain appartenant à l'espèce *T. maritimum*, notre approche MPST nous a donc permis de discriminer 2 à 5 isoformes/pic (équivalent aux ATs), 20 combinaisons différentes, ou MALDI-types (équivalent aux STs), et 4 groupes (équivalent aux CCs) ainsi qu'un singleton (Bridel *et al.*, 2020).

De l'intérêt d'un site web intégrant une base de données et des outils d'analyse

Un des avantages majeurs de la MLST par rapport à toutes les approches traditionnelles a été le développement de bases de données regroupant pléthore d'espèces bactériennes, leurs différentes formes alléliques et des outils d'analyse. Ces bases de données, interrogeables à distance (cf. <https://pubmlst.org/>), permettent d'effectuer des suivis épidémiologiques en temps réel et à l'échelle mondiale ainsi que la comparaison fine de souches. Elles ont largement contribué au succès de cette approche.

Nous avons donc développé un outil en ligne, MALDIquant-TypeR, qui intègre les spectres de référence ainsi que les algorithmes élaborés durant ce projet (<http://genome.jouy.inra.fr/shiny/malდიquanttyper/>). Il permet de charger les spectres d'un isolat, puis de les comparer à l'intégralité de ceux des espèces du genre *Tenacibaculum* présentes dans notre base de données. Il intègre des outils d'identification basés sur la comparaison du spectre entier d'un isolat de terrain, mais également basés sur des biomarqueurs spécifiques identifiés pour différentes espèces pathogènes du genre. Si l'échantillon est identifié comme appartenant à l'espèce *T. maritimum*, l'outil applique le schéma de typage décrit dans cet article et propose une attribution pour chacun des 9 biomarqueurs retenus. Lorsqu'ils sont tous identifiés dans un échantillon, l'outil affiche le MALDI-type correspondant.

Conclusion

Les outils de diagnostic sont essentiels pour une détection précoce des maladies, en particulier en l'absence de signes cliniques spécifiques et parce que l'agent causal pourrait être allochtone, émergent ou la maladie d'origine multifactorielle (de Lorgeril *et al.*, 2018). Ainsi, des approches non ciblées (à la différence de la plupart des techniques employant des réactions de PCR) sont à privilégier, notamment pour les pathologies en aquaculture, aussi bien des mollusques que des poissons (Moussa *et al.*, 2021). La caractérisation d'isolats par MALDI-TOF MS est une approche générique, non ciblée et très efficace lorsqu'il s'agit d'étudier un grand nombre d'échantillons. La rapidité d'acquisition des données et de leur ana-

lyse ainsi que la fiabilité des informations qu'elles contiennent sont des avantages indéniables en comparaison avec d'autres méthodes plus traditionnelles, comme les tests biochimiques ou la sérologie, ou plus modernes et ciblées comme la MLST. Comparée à cette dernière, l'approche par MALDI-TOF sacrifie un peu en précision pour gagner grandement en rapidité et en coût. C'est donc l'outil idéal pour réaliser des primo-analyses sur un grand nombre d'isolats afin de sélectionner ceux susceptibles d'être étudiés plus en détail (par exemple, par séquençage de génomes complets).

Il faut cependant garder à l'esprit que les spectres générés par MALDI-TOF MS sont des données analogiques complexes par nature (soumises au bruit de fond intrinsèque des appareils, à la méthode de culture des bactéries, à la préparation des échantillons, à la matrice d'ionisation utilisée, etc.). Elles se différencient donc des données de séquençage qui sont de nature numérique (présence de la base A, T, G ou C à la position n de la séquence) et nécessitent un traitement du signal adapté. Par ailleurs, l'emploi en routine du MALDI-TOF MS s'est, jusqu'à présent, essentiellement focalisé sur des espèces bactériennes bien caractérisées et d'importance clinique. Les banques de données commerciales ne contiennent pas ou peu d'espèces bactériennes « exotiques » ; il est donc nécessaire de construire sa propre bibliothèque de spectres de référence quand on s'intéresse à des taxons bactériens insolites, non encore inclus dans les banques de données existantes. Si l'identification de l'espèce ne semble pas poser de problèmes majeurs (sous réserve des éléments évoqués précédemment), l'emploi du MALDI-TOF MS pour entreprendre du typage est une entreprise plus ardue. Elle nécessite de combiner des approches de génomique analytique pour identifier des biomarqueurs susceptibles d'être observables dans les spectres. Ces étapes sont chronophages,

et l'implémentation d'algorithmes de traitements dédiés nécessite de réelles compétences en bioinformatique. Cependant, passées ces étapes de développement, la stratégie se révèle redoutablement performante. Elle permet de cribler à grande vitesse et à très faible coût des centaines ou milliers d'isolats bactériens. Un autre avantage non négligeable de la méthode est qu'elle fonctionne aussi bien sur des cultures fraîches que sur des cultures conservées sous forme inactivée jusqu'à 15 jours dans une solution d'éthanol, ce qui permet leur acheminement vers des laboratoires équipés de spectromètres de masse MALDI-TOF éloignés des sites de production. Cette facilité de transport favorise grandement les envois internationaux, les bactéries fixées en éthanol n'étant pas soumises à toutes les formalités administratives liées au transport de matériel biologique vivant, en particulier quand il s'agit d'agents pathogènes. Depuis la publication de ce travail, en 2020 (Bridel *et al.*, 2020), nous avons pu caractériser, par cette technique, plusieurs centaines d'isolats appartenant au genre *Tenacibaculum*, en provenance de Norvège, du Chili et de Polynésie française. Enfin, le déploiement de l'outil en ligne, MALDIquant-TypeR, devrait faciliter, dans un proche avenir, des études épidémiologiques à large échelle.

On peut enfin noter que des approches purement bioinformatiques (e.g., analyses du panspectrome, clustering et recherche de co-occurrences multiples de pics intégrant des méthodes statistiques) pourraient peut-être éviter, dans le futur, de passer par la recherche systématique de biomarqueurs pour réaliser du typage, ou du moins permettre de discriminer des groupes à l'échelle infra-espèce (Giraud-Gatineau *et al.*, 2020). Cependant, ces approches nécessitent de très grands jeux de données (au minimum 600 spectres de référence par espèce ciblée) et ne seront sans doute pas applicables à l'ensemble des espèces bactériennes. ■

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement Jean-François Bernardet pour avoir construit et entretenu, pendant quarante ans, la souchothèque de l'équipe Infection et Immunité des poissons de l'Unité Virologie et Immunologie Moléculaires, pour ses précieux conseils et pour sa contribution à l'amélioration de ce document ; Tatiana Rochat pour sa contribution à l'amélioration de ce document ; Frédéric Bourgeon et l'entreprise Bio Chêne Vert pour avoir réalisé l'ensemble des spectres MALDI-TOF analysés dans le travail cité ; ce dernier a fait l'objet de la thèse CIFRE de Sébastien Bridel en partenariat avec l'entreprise Labofarm (groupe Finalab). Ce travail a reçu le soutien financier Carnot France Futur Élevage F2E 2017, projet « FishPathoMaldi ».

Références

Bridel S., Olsen A.B., Nilsen H., Bernardet J.F., Achaz G., Avendaño-Herrera R. And Duchaud E., 2018. Comparative genomics of *Tenacibaculum dicentrarchi* and "*Tenacibaculum finnmarkense*" highlights intricate evolution of fish-pathogenic species. *Genome Biol Evol.* 2018 Feb 1;10(2):452-457. doi: 10.1093/gbe/evy020. PMID: 29360975; PMCID: PMC5793721.

Bridel S., Bourgeon F., Marie A., Saulnier D., Pasek S., Nicolas P., Bernardet J.F. and Duchaud E., 2020. Genetic diversity and population structure of *Tenacibaculum maritimum*, a serious bacterial pathogen of marine fish: from genome comparisons to high throughput MALDI-TOF typing. *Vet Res.* 2020 May 7;51(1):60. doi: 10.1186/s13567-020-00782-0. PMID: 32381115; PMCID: PMC7204230.

Carbonnelle E. And Nassif X., 2011. Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale [Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory]. *Med Sci (Paris).* 2011 Oct;27(10):882-8. French. doi: 10.1051/medsci/20112710017. Epub 2011 Oct 21. PMID: 22027426.

Croxatto A., Prod'homme G. And Greub G., 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Mar;36(2):380-407. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x. Epub 2011 Aug 22. PMID: 22092265.

De Lorgeril J., Lucasson A., Petton B., Toulza E., Montagnani C., Clerissi C., Vidal-Dupiol J., Chaparro C., Galinier R., Escoubas J.M., Haffner P., Dégremont L., Charrière G.M., Lafont M., Delort A., Vergnes A., Chiarello M., Faury N., Rubio T., Leroy M.A., Pérignon A., Régler D., Morga B., Alunno-Bruscia M., Boudry P., Le Roux F., Destoumieux-Garzn D., Gueguen Y. and Mitta G., 2018. Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat Commun.* 2018 Oct 11;9(1):4215. doi: 10.1038/s41467-018-06659-3. PMID: 30310074; PMCID: PMC6182001.

FAO, 2020. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2020 : La durabilité en action. <http://www.fao.org/3/ca-9231fr/CA9231FR.pdf>.

Gibb S. and Strimmer K. 2012. MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. *Bioinformatics.* 2012 Sep 1;28(17):2270-1. doi: 10.1093/bioinformatics/bts447. Epub 2012 Jul 12. PMID: 22796955.

Giraud-Gatineau A., Texier G., Garnotel E., Raoult D. and Chaudet H., 2020. Insights into subspecies discrimination potentiality from bacteria MALDI-TOF Mass Spectra by using data mining and diversity studies. *Front Microbiol.* 2020 Aug 13;11:1931. doi: 10.3389/fmicb.2020.01931. PMID: 32903575; PMCID: PMC7438549.

Hou T.Y., Chiang-Ni C. and Teng S.H., 2019. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J Food Drug Anal.* 2019;27:404-14.

Kang L., Li N., Li P., Zhou Y., Gao S., Gao H. et al, 2017. MALDI-TOF mass spectrometry provides high accuracy in identification of *Salmonella* at species level but is limited to type or subtype *Salmonella* serovars. *Eur J Mass Spectrom (Chichester).* 2017;23:70-82.

Moussa M., Cauvin E., Le Piouffle A., Lucas O., Bidault A., Paillard C., Benoit F., Thuillier B., Treilles M., Travers M.A. and Garcia C., 2021. A MALDI-TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. potentially pathogenic to marine mollusks. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021 Feb 15. doi: 10.1007/s00253-021-11141-0. Epub ahead of print. PMID: 33590268.

Muniesa A., Basurco B., Aguilera C., Furones D., Reverté C., Sanjuan-Vilaplana A., Jansen M.D., Brun E. And Tavorpanich S., 2020. Mapping the knowledge of the main diseases affecting sea bass and sea bream in Mediterranean. *Transbound Emerg Dis.* 2020 May;67(3):1089-1100. doi: 10.1111/tbed.13482. Epub 2020 Jan 30. PMID: 31960605.

Nowlan J.P., Lumsden J.S. and Russell S., 2020. Advancements in characterizing *Tenacibaculum* infections in Canada. *Pathogens.* 2020 Dec 8;9(12):1029. doi: 10.3390/pathogens9121029. PMID: 33302445; PMCID: PMC7763822.

Olsen A.B., Spilsberg B., Nilsen H.K., Lagesen K., Gulla S., Avendaño-Herrera R., Irgang R., Duchaud E. and Colquhoun D.J., 2020. *Tenacibaculum piscium* sp. nov., isolated from skin ulcers of sea-farmed fish, and description of *Tenacibaculum finnmarkense* sp. nov. with subdivision into genomovars *finnmarkense* and *ulcerans*. Int J Syst Evol Microbiol. 2020 Dec;70(12):6079-6090. doi: 10.1099/ijsem.0.004501. PMID: 33079030.

Palarea-Albaladejo J., Mclean K., Wright F., Smith D.G.E., 2018. MALDIrppa: quality control and robust analysis for mass spectrometry data. Bioinformatics. 2018;34:522-3.

Riley L. and Blanton R., 2018. Advances in molecular epidemiology of infectious diseases: definitions, approaches, and scope of the field*. microbiol-spec 6(6): doi:10.1128/microbiol-spec.AME-0001-2018.

Ryzhov V. and Fenselau C., 2001. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. Anal Chem 73:746-750.

Sauget M., Valot B., Bertrand X. and Hocquet D. Can MALDI-TOF Mass Spectrometry reasonably type bacteria? Trends Microbiol. 2017;25:447-55.

Singhal N., Kumar M., Kanaujia P.K., Viridi J.S., 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front Microbiol. 2015;6. doi:10.3389/fmicb.2015.00791.

Spinali S., Van Belkum A., Goering R.V., Girard V., Welker M., Van Nuenen M. et al., 2015. Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: do we need guidance for data interpretation? J Clin Microbiol. 2015;53:760-5.

Wieser A., Schneider L., Jung J. and Schubert S., 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). Appl Microbiol Biotechnol. 2012 Feb;93(3):965-74. doi: 10.1007/s00253-011-3783-4. Epub 2011 Dec 25. PMID: 22198716.

World Bank, 2014. Reducing disease risks in aquaculture. World Bank Report #88257-GLB.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Caractérisation de la collection caprine de la Cryobanque nationale pour une meilleure gestion des races menacées

Coralie DANCHIN¹

CORRESPONDANCE

coralie.danchin@idele.fr

RÉSUMÉ

En France, la conservation des races de ferme combine gestion de terrain (ou *in situ*) et préservation à long terme de matériel reproductif dans l'azote liquide (ou conservation *ex situ*), en lien avec la Cryobanque nationale, un des CRB du pilier animal de RARe. Pour les races caprines locales, les boucs inclus en Cryobanque ont été échantillonnés à partir d'informations généalogiques, dont la connaissance était parfois très partielle. L'utilisation de ces mâles par Insémination Animale (ou IA) est donc parfois limitée faute d'informations fiables. Différents projets de recherche français ou européens ont permis le financement d'échantillonnage et de génotypage (puce caprine 50 K) d'animaux de 5 races locales de chèvres à petits effectifs (Fossés, Lorraine, Poitevine, Provençale, Pyrénées) provenant de la population active et de la collection *ex situ*. À partir de ces informations de génotypages, l'objectif de notre étude, financée par le projet H2020 IMAGE (<https://www.imageh2020.eu>), a été de mieux caractériser les collections caprines présentes en Cryobanque, en les comparant avec la population *in situ*. Le degré d'introgression génétique a également été évalué pour ces mâles afin de s'assurer qu'ils pouvaient bien être définis comme de «pure race». Différents indicateurs ont été calculés, qui ont permis de déterminer les liens de parenté réels entre les animaux, d'identifier les animaux croisés et de cibler les souches présentes dans les populations vivantes, mais absentes de la Cryobanque. Ces résultats ont permis une meilleure caractérisation de la collection caprine de la Cryobanque, facilitant ainsi des utilisations futures ; de même que la gestion de ces races à court et moyen terme a pu être affinée en lien avec les associations d'éleveurs.

MOTS-CLÉS

Cryobanque, génotypage, races menacées, caprin.

¹ Institut de l'Élevage, Paris, France.

Characterisation of the caprine collection of the national cryobank for better management of threatened races

Coralie DANCHIN¹

CORRESPONDENCE

coralie.danchin@idele.fr

ABSTRACT

In France, the conservation of farm races combines field (or *in situ*) management and the long-term preservation of reproductive material in liquid nitrogen (or conservation *ex situ*), in relation with the national cryobank, one of the BRCs of the animal division of the AgroBRC/RARe. Regarding local goat races, the bucks included in the Cryobank were sampled from genealogical data, knowledge of which was sometimes very partial. The use of these males for Animal Insemination (or AI) is therefore sometimes limited for want of reliable information. Different French and European research projects have permitted financing the sampling and genotyping (50 K caprine chip) of animals from 5 local races of goats, with small numbers (Fossés, Lorraine, Poitevine, Provençale, Pyrénées) from the active population and from the collection *ex situ*. On the basis of this genotyping data, the objective of our study funded by the H2020 IMAGE project (<https://www.imageh2020.eu>) was to better characterise the caprine collections present in the Cryobank, by comparing them with the population *in situ*. The degree of genetic introgression has also been assessed for these males to ensure they can be defined as «pure race». Different indicators were calculated, which have permitted determining the real family relations between the animals, identifying the crossed animals, and targeting the strains present in living populations but absent from the Cryobank. These results permitted better characterisation of the caprine collection of the Cryobanque, thereby facilitating future uses. Likewise, the management of these races in the short and medium terms was refined in relation with breeding associations.

KEYWORDS

Cryobank, genotyping, rare breeds, goat.

¹ Institut de l'Élevage, Paris, France.

Introduction

La conservation des races à petits effectifs s'appuie en France sur les recommandations du plan d'action de la FAO (2007), à savoir le suivi et la gestion des races en ferme (ou conservation *in situ*) et la conservation, puis l'utilisation de matériel reproductif conservé dans l'azote liquide (cryoconservation ou conservation *ex situ*). Pour cette partie, en 1999, un Groupement d'Intérêt Scientifique appelé Cryobanque nationale a été constitué par conventionnement entre douze acteurs de la sélection animale, dont le Ministère chargé de l'Agriculture, l'INRA, l'Institut de l'Élevage, Races de France et ALLICE, afin de fédérer, rationaliser et sécuriser des collections de matériel biologique conservées dans l'azote liquide. En 2009, la Cryobanque a reçu le label Centre de Ressources Biologiques (CRB) du GIS IBISA. Plus de 20 ans après sa création, la collection nationale avoisine les 435 000 doses provenant de 21 espèces différentes (www.cryobanque.org). L'enrichissement des collections a notamment bénéficié de l'appui financier apporté par le Projet d'infrastructure « CRB-Anim », financé par le Programme Investissements d'Avenir, alors que la gestion et la conservation des collections bénéficient d'une dotation annuelle du ministère chargé de l'agriculture.

De façon plus spécifique pour l'espèce caprine, de la semence de boucs de races locales françaises a été collectée, depuis plus de 20 ans, afin de préserver la variabilité génétique de ces races, et une partie des stocks a été mise en Cryobanque. L'échantillonnage a été réalisé afin de maximiser la variabilité génétique, sur la base des pedigrees. Cependant, dans la plupart des cas, la fiabilité et/ou la profondeur des pedigrees dans ces races sont limitées, et plusieurs mâles ont été collectés sans information sur les généalogies, à partir de dire d'éleveurs. L'utilisation de ces mâles par Insémination Animale (ou IA) est donc parfois limitée faute d'informations fiables.

Depuis une petite dizaine d'années, en caprins, une nouvelle technique dite « puce de génotypage » permet de lire les informations provenant de l'analyse de la molécule support de l'hérédité, l'ADN pour un nombre important de positions sur cette molécule (plus de 54 000 positions de Single Nucleotide Polymorphism ou SNP). L'analyse de ces données permet la création d'indicateurs qui aident à mieux estimer à la fois la variabilité génétique (analyse de la diversité à l'intérieur d'une race) et, en les comparant, l'analyse de la diversité entre les races. Il est également possible d'estimer le degré de croisement d'un animal à partir de ces données. Grâce à une série de projets, des prélèvements sanguins et des génotypages ont été réalisés

pour les races à petits effectifs suivantes : Fossés, Lorraine, Poitevine, Provençale, Pyrénées, pour des animaux actifs et des boucs conservés en Cryobanque.

À partir de ces informations de génotypages, l'objectif de notre étude, financée par le projet H2020 IMAGE (www.imageh2020.eu), a été de mieux caractériser les collections caprines présentes en Cryobanque, en les comparant avec la population *in situ*. Le degré d'introgression génétique a également été évalué pour ces mâles afin de s'assurer qu'ils pouvaient bien être définis comme de « pure race ».

Matériels et méthodes

Races étudiées et échantillonnage des boucs en cryoconservation

Le choix des races étudiées dans cet article a été restreint aux races locales caprines dont de la semence d'au moins 10 boucs a été collectée pour la cryoconservation. Le tableau 1 reprend le nombre de boucs cryoconservés en Cryobanque, ceux dont de la semence a été génotypée, les effectifs totaux estimés de la race en 2020 et le nombre totaux d'animaux génotypés. Une brève description de ces races et de leurs programmes de conservation a été réalisée par Danchin-Burge et Duclos (2008).

Tableau 1 : Effectifs totaux des races, nombre total d'animaux génotypés, nombre de boucs cryoconservés et génotypés

RACE	EFFECTIF TOTAL (FEMELLES /2020)	NBRE TOTAL DE GÉNOTYPAGES	BOUCS CRYOCONSERVÉS	BOUCS D'IA GÉNOTYPÉS	TAUX MOYEN DE RÉGÉNÉRATION
Fossés	1 600	43	19	12	97
Lorraine	1 000	3	10	8	
Poitevine	4 400	57	32	10	81
Provençale	1 800	86	10	10	91
Pyrénées	4 000	66	13	7	

Pour ces cinq races, la majorité des effectifs des élevages professionnels sont traits, mais on note également une proportion importante d'élevages allaitants en race des Pyrénées. L'éco-pâturage est une activité en croissance, particulièrement en Fossés et Lorraine. Enfin, les éleveurs amateurs représentant une part active de la conservation de ces races, en particulier en Fossés, Poitevine et Lorraine, ce sont en Provençale et en Pyrénées que la part des éleveurs professionnels est la plus importante. Le berceau des races est reflété dans leur nom, en dehors de la Fossés qui est élevée sur un territoire large de l'Ouest de la France (Bretagne, Normandie, Pays de la Loire).

À l'aube des années 1990, la menace de disparition quasi totale des ressources génétiques caprines françaises est une particularité dans le paysage de la conservation des espèces d'élevage en France. Les facteurs qui ont mené à cette situation ont été décrits par Danchin-Burge et Duclos (2008). Retenons particulièrement l'absence de la standardisation de ces races – en dehors de la Poitevine – qui a mené à les écarter des systèmes de production, cette variabilité étant suspectée comme une preuve qu'il s'agissait de populations composites, indésirables à l'époque. Les travaux menés à partir des premières campagnes d'échantillonnage et de génotypages (voir Échantillonnage et données de génotypages) ont pu montrer précisément que toutes ces races, bien que variables d'un point de vue du standard, constituaient des groupes distincts les uns des autres (Oget et al., 2019). Les programmes de conservation de ces races s'appuient sur des actions de terrain, dont l'élément fondamental est le recueil des généalogies par les associations de races (Lorraine, Poitevine, Pyrénées), accompagnées par l'Institut de l'Élevage (Fossés, Provençale). Ce recueil d'informations permet d'établir des bilans démographiques, de variabilité génétique (bilans « VARUME » de l'Institut de l'Élevage¹), et de procéder au repérage de boucs d'IA.

La cryoconservation de semence en races locales caprines a pour but la conservation à très long terme de leur patrimoine génétique. Suivant les conseils de la FAO (2012), l'objectif est de conserver 25 mâles non apparentés par race, avec 200 doses par bouc, répartis sur deux sites pour des raisons de sécurité. Dans un premier temps, les boucs sont repérés en fonction de leur originalité génétique calculée à partir de leurs généalogies (degré d'apparentement avec la population, parenté entre boucs d'IA). Ce travail est réalisé par les associations de races, parfois avec l'appui de l'Institut de l'Élevage. Dans un second temps, les associations vérifient que les candidats sont représentatifs de la race au niveau de la morphologie.

Logistique de la collecte

La collecte de semence de boucs est une opération lourde, que ce soit par son coût, qui nécessite des recherches de financement spécifiques (la collecte de deux cents doses par bouc se chiffre à environ 1 500 € HT), ou par la logistique à mettre en place. Quand les premières actions de collecte ont démarré, le centre de production, CAPGÈNES, a préconisé la recherche de boucs âgés pour s'assurer de leur bon comportement sexuel. Actuellement, on oriente l'échantillonnage vers des boucs jeunes, nés en début d'année, pour une collecte à l'automne qui est la période natu-

relle des saillies pour ces races cyclées. De plus, pour entrer en centre de collecte, les boucs doivent être non porteurs d'une série de maladies assez fréquentes en races locales, dont le CAEV, ce qui limite souvent le choix final, et parfois drastiquement. Or, les boucs âgés sont plus susceptibles d'être porteurs de maladies que des jeunes boucs qui n'ont jamais sailli, d'où le changement de paradigme.

Il faut ensuite assurer le transport des animaux (y compris son financement) jusqu'au seul centre d'IA agréé en France, CAPGÈNES, situé à Mignaloux-Beauvoir (86), sachant que, en dehors de la race Poitevine, le berceau des races locales est situé à plusieurs centaines de kilomètres (Provence et Pyrénées, en particulier). Enfin, une fois en centre, les boucs sont mis en quarantaine, et il arrive que leur sérologie change en raison du stress provoqué par le transport et le changement du lieu d'élevage, en particulier pour les maladies de type CAEV, ce qui aboutit à leur disqualification. Les boucs sont ensuite entraînés sur un mannequin de monte. Certains boucs s'avèrent inaptes à cette éducation, en particulier s'ils ont été peu familiarisés à une manipulation par l'Homme. Ensuite, même s'ils acceptent d'être prélevés, leur semence peut être insuffisamment fertile pour être congelée (33 % des boucs collectés sur 72 boucs de races locales ; chiffres CAPGÈNES/IDELE) et, enfin, que la semence ne soit pas congelable (42 % des 55 boucs de races locales ayant pu être collectés avec de la semence fertile ; chiffres CAPGÈNES/IDELE).

Le détail de la logistique de collecte permet d'expliquer l'écart entre les échantillonnages souhaités et les collections réalisées ; cela explique que des solutions pragmatiques soient parfois appliquées. Par exemple, quand un élevage est connu pour avoir un état sanitaire compatible avec la réglementation de l'IA, des demi-frères sont parfois entrés en centre, puisque en moyenne les collectes sont fructueuses pour 50 % des animaux échantillonnés.

Finalement, la variabilité du nombre de boucs cryoconservés par race provient à la fois des financements trouvés par les différentes associations d'éleveurs ces 20 dernières années, de l'ancienneté des programmes de conservation, des effectifs des races et de l'accompagnement que l'association des éleveurs a pu mettre en place pour assurer la logistique des opérations. À noter que le programme CRB-Anim a permis d'augmenter significativement les collections caprines, puisque l'intégralité des boucs de la race Lorraine ont été prélevés grâce à ces financements : 5 des boucs Fossés, 2 des Poitevins, 7 des Provençaux et 2 des Pyrénéens.

1 <https://idele.fr/detail-dossier/bilan-de-variabilite-genetique-pour-les-filieres-caprines-ovines-et-bovines>

Échantillonnage et données de génotypages

Les premiers génotypages réalisés pour les races locales caprines ont été faits à partir de prélèvements réalisés pour différents projets de recherche, dans les années 2000, où les associations de races et l'Institut de l'Élevage n'avaient pas été mandatés pour procéder à l'échantillonnage. Les premières analyses réalisées (Oget et al., 2018) ont montré qu'il était probable que certaines origines génétiques importantes manquaient dans la représentation des races, en particulier pour celles avec un large berceau (Fossés, Pyrénées). Pour cette raison, le groupe pilote « ruminants » de CRB-Anim a validé le financement, par ce projet, d'une campagne spécifique de prélèvement et de génotypages des races locales s'appuyant sur l'expertise des associations d'éleveurs et de l'Institut de l'Élevage. Par ailleurs, depuis 2019, les boucs d'IA de races locales sont systématiquement génotypés par le centre de collecte CAPGÈNES. Pour les boucs d'IA plus anciens, le génotypage nécessite une logistique différente, puisque les analyses doivent être réalisées à partir des doses congelées au lieu de sang. Cette opération étant plus compliquée à réaliser, un choix a dû être réalisé parmi les animaux existants. Ont été privilégiés les boucs pour lesquels on disposait le moins d'information généalogique, ceux prélevés en début de programme de conservation et/ou dont on soupçonnait le croisement éventuel avec une autre race. Enfin, afin de repérer d'éventuelles traces de croisements, les génotypages de races disponibles librement par le consortium ADAPTMAP (<https://datadryad.org/stash/dataset/doi:10.5061/dryad.v8g21pt>), ainsi que des génotypages en race Rove réalisés grâce au projet CRB-Anim ont été inclus dans les analyses.

L'ensemble des animaux ont été génotypés à l'aide de la puce GoatSNP50 BeadChip (Illumina, Inc.) développée par l'International Goat Consortium (Tosser-Klopp et al., 2014). Un contrôle qualité du jeu de données a été effectué à l'aide de PLINK v1.90 (Chang et al., 2015) en conservant les SNP dont le taux de réussite était supérieur à 0,95 et en éliminant les variants dont la fréquence était inférieure à 5 % (Minor Allele Frequency ou MAF), et ceux pour lesquels il manquait au moins 5 % de données génotypées.

Indicateurs calculés

Les parentés génomiques ont été calculées pour tous les animaux deux à deux, c'est-à-dire en calculant la parenté de chaque animal avec successivement tous les autres animaux de la population. La matrice de parenté génomique est transformée en coordonnées d'Analyse en Composante Principale (ACP) grâce à la fonction ad hoc de PLINK ; pour

les figures, nous avons utilisé des fonctions de représentation graphique du logiciel R.

Pour l'évaluation du degré de croisement, l'approche a été réalisée en deux temps à partir de l'utilisation du logiciel ADMIXTURE (Alexander et al., 2009). Dans un premier temps, l'ensemble des animaux ont été intégrés dans l'analyse, afin de repérer les animaux avec des traces évidentes de croisement. Dans un second temps, un sous échantillon a été réalisé en conservant uniquement, par race, les animaux ayant une parenté génomique inférieure à 0,125 (fonction -rel-cutoff du logiciel PLINK) et les animaux avec une consanguinité inférieure à 12,5. La consanguinité des animaux a été estimée à partir de régions montrant très peu de variabilité du génome, appelées Run of Homozygosity (ROH), calculées en utilisant les scripts développés par Gorssen et al. (2021). Cette précaution a été prise afin d'obtenir une valeur la plus juste possible des croisements détectés, ces deux facteurs, parenté des animaux et consanguinité élevée, influençant défavorablement les estimations réalisées par le logiciel ADMIXTURE. Dans la mesure du possible, les boucs d'IA ont été choisis comme « tête de lignée » des animaux non apparentés. Le nombre optimal de clusters k a été estimé en ajoutant un indicateur de qualité (Alexander et al., 2009). Le nombre de cluster k a été varié de 8 à 12 et la valeur de $k=10$, soit le k avec l'indicateur de qualité avec la plus faible erreur, a été utilisée afin de choisir le nombre optimal de clusters pour l'ensemble des génotypes étudiés.

Résultats et discussion

Au démarrage des programmes de conservation, les boucs disponibles pour être collectés étaient en général peu nombreux et les informations généalogiques limitées. Suite à l'utilisation des prélèvements par insémination, certaines associations d'éleveurs ont pu avoir des doutes sur la pureté de ces boucs ou sur les relations généalogiques affichées. L'intérêt majeur des données génomiques est qu'elles constituent une nouvelle source d'information pour estimer la parenté et les croisements. Le calcul des parentés génomiques nous a permis de positionner les boucs d'IA par rapport à des animaux actifs ; un exemple est donné dans la figure 1 pour la race Fossés. Le résultat le plus frappant est le positionnement distant des boucs Napoléon (IANAPO) et Nucléo (IANUCL), qui étaient considérés comme pleins-frères puisque nés dans la même portée. La conclusion est, qu'en caprin, une gestation peut comporter des chevreaux avec des pères différents. Cela veut aussi dire que la variabilité génétique de la collection est plus large que prévue, puisque ces deux boucs étaient considérés comme

plein frères, alors qu'ils ne sont que demi-frères. Cette représentation a permis aussi de positionner des boucs dont les généalogies étaient inconnues ou très courtes, comme Manton (IAMant), Raoul (IARaou), Onenn (IAOnen) ou encore Tournesol (IATour). Ce panorama montre, également, que les grands types de souches sont présents à l'IA, en dehors d'un groupe, qui paraît également plus rare dans la population active, représenté par les animaux Harry Potter (HARR) et D'Artagnan (DAR).

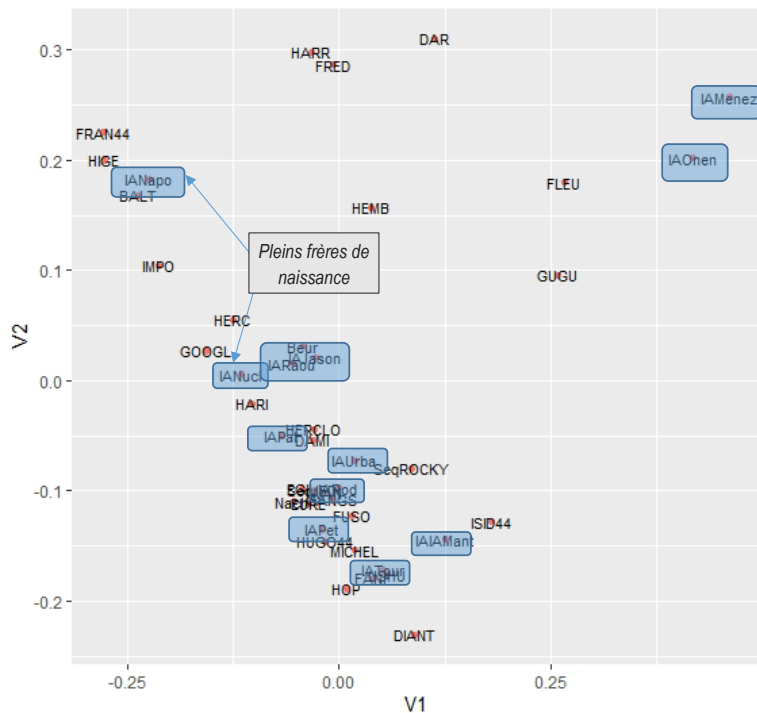


Figure 1. ACP pour les deux premières composantes (V1, V2) à partir des données de parenté génomique en race Fossés ; les 10 boucs d'insémination sont identifiés en bleu.

L'association d'éleveurs a pris en compte ces indicateurs pour les prochaines campagnes de collecte de boucs d'insémination en tâchant de repérer des animaux provenant de souches non représentées. Des indicateurs équivalents ont été calculés race par race et fournis aux associations d'éleveurs. Ces informations ont permis d'élucider des relations de parenté pour 4 boucs en race Provençale, 2 en Poitevine, et l'intégralité de la collection génotypée en race Pyrénées. En race Lorraine, cela a permis de confirmer que l'échantillonnage par « famille » réalisé par l'association correspondait bien à la structure génétique de la population. Un autre attendu important des associations d'éleveurs était l'estimation de la présence d'allèles de races exogènes chez les animaux de la collection. L'interprétation des résultats du logiciel utilisé est néanmoins sujette à caution, les hypothèses sous-jacentes à son fonctionnement étant adaptées au phénomène de spéciation plus que de racia-

tion. Comme signalé dans la description des méthodes, il est impératif d'éliminer les animaux très apparentés et consanguins pour ne pas biaiser fortement les indicateurs finaux. Par ailleurs, l'introduction de nouvelles races ou de souches éloignées des échantillonnages précédents peut faire varier les résultats d'une simulation à l'autre. Néanmoins, les croisements avec des races peu apparentées, comme l'Alpine ou la Saanen, peuvent être repérés avec cette méthode. Par exemple, en chèvre des Fossés (Figure 2), le bouc d'IA Manton (IAIAMant) est caractérisé comme porteur de marqueurs Saanen et Alpin pour un quart de ses gènes ; ce bouc a, depuis, été déqualifié de la race et un fils, Jason (IAJason), a été créé par accouplement programmé avec une souche qui avait été caractérisée comme pure lors d'un travail précédent. Cette stratégie s'est avérée payante, puisque Jason a effectivement à peu près la moitié des marqueurs génétiques de l'origine alpine de son père.

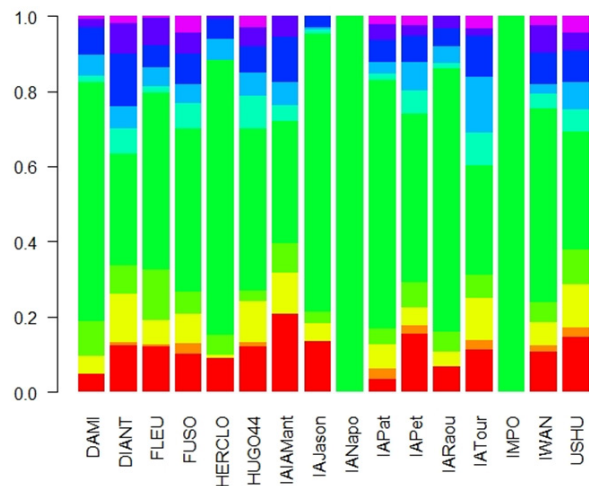


Figure 2. Détail de l'origine raciale des boucs de la race Fossés selon le résultat d'Admixture pour k=10. Légende des flux de gènes les plus importants : en vert= Fossés ; rouge= Alpine ; jaune= Pyrénées ; Bleu cyan=Saanen ; Bleu foncé=Corse

Le même travail a été effectué en race Poitevine, et la représentation de la race après tri des animaux est décrite dans la figure 3. La race apparaît beaucoup plus homogène que la chèvre des Fossés : sa standardisation est ancienne et date d'au moins un siècle ; son berceau est plus restreint que celui de la chèvre des Fossés. Dans ce contexte, les traces de croisement apparaissent plus clairement et sont moins soumises aux aléas d'échantillonnage que dans une race plus variable. L'étude ciblée plus spécifiquement pour les boucs d'IA (non figurée ici) montre des traces faibles de croisement, voire inexistantes, pour les boucs de la Cryobanque.

En Pyrénées, les origines de trois boucs collectés en début de programme étaient sujettes à caution, et les données de génotypage ont confirmé que ces boucs ont une constitution génétique très différente de celle des animaux actifs.

Néanmoins, il est difficile d'être plus affirmatif dans les conclusions, les pourcentages de marqueurs étrangers attribués à ces boucs par ADMIXTURE variant assez fortement en fonction des races intégrées dans l'échantillonnage. Deux hypothèses restent possibles : soit ces boucs sont porteurs de gènes d'une race étrangère non encore testée dans nos comparaisons, par exemple des races espagnoles en raison de la proximité géographique ; soit ces boucs représentent justement une souche qui n'existe plus dans la population active, et dont les allèles des gènes ont pu être sauvés grâce aux collections de la Cryobanque.

Conclusion

L'analyse de données de génotypages de races caprines menacées provenant d'animaux actifs et de collections de la Cryobanque a permis de déterminer les liens de parenté réels entre les animaux, en particulier pour ceux dont les généalogies étaient peu connues voire inexistantes, d'identifier des animaux croisés et de cibler les origines génétiques présentes dans les populations vivantes mais non représentées en Cryobanque.

Les résultats ont été présentés aux représentants des éleveurs des races de chèvres locales françaises. Cette caractérisation des collections est à considérer comme une réussite. Les indicateurs ont été utilisés pour orienter les choix futurs des mâles à cryoconserver, mieux ajuster le choix des éleveurs pour leurs accouplements raisonnés avec les mâles d'IA, et, dans un cas, écarter de la collection un mâle de la race Fossés qui s'est avéré croisé. Enfin, ces présentations ont permis de convaincre une association d'éleveurs, dont la race manquait à l'appel, de participer aux études suivantes sur la diversité des races et de faire collecter des mâles pour l'IA. ■

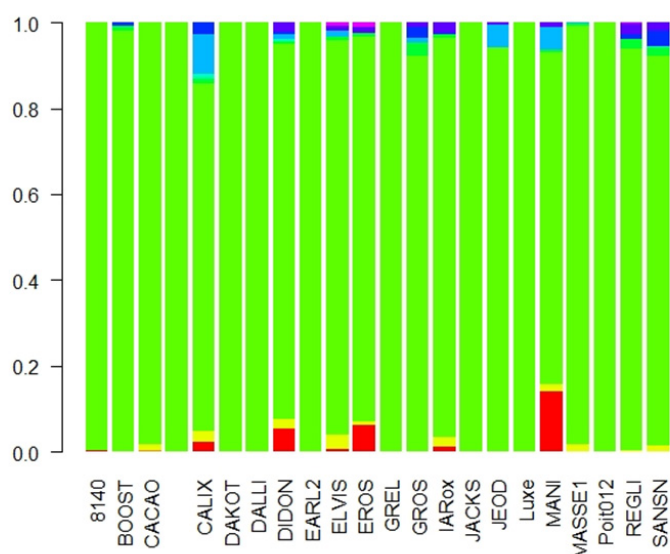


Figure 3. Détail en race Poitevine du résultat d'Admixture pour k=10. Légende des flux de gènes les plus importants : en vert= Poitevine ; rouge= Alpine ; jaune= Pyrénées ; Bleu cyan=Saanen.

Remerciements

Nous remercions ici les associations d'éleveurs, CAPGÈNES et IDELE pour la logistique associée et la consolidation des données.

Financement

Les génotypages ont été financés par :

- les projets OPA, ADAPTMAP et VARGOATS dont le coordonnateur français est l'unité INRAE GENPHYSE (Alpine, Saanen, Fossés, Lorraine, Poitevine, Provençale, Rove) ;
- un projet de recherche mené par A. CAPITAN (ALLICE) pour des échantillons Provençale ;
- CRB ANIM, un projet du programme Investissements d'Avenir de l'ANR (Fossés, Lorraine, Poitevine, Provençale, Rove).

Pour les races locales, une partie des prélèvements qui ont permis la réalisation des génotypages ont également été financés par le projet CRB ANIM.

Les recherches qui ont conduit à ces résultats ont été menées dans le cadre du projet IMAGE qui a reçu un financement du programme de recherche et d'innovation Horizon 2020 de l'Union européenne, dans le cadre de la convention n° 677353.

Références

- Alexander D.H., Novembre J., Lange K., 2009. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19:1655-1664.
- Chang C.C., Chow C.C., Tellier L.C., Vattikuti S., Purcell S.M., Lee J.J., 2015. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience*. 4:7.
- Danchin-Burge C., Duclos D., 2008. Situation et perspectives d'avenir des races caprines à petits effectifs. *Ethnozootecnie N° 85* p 17-32.
- FAO, 2007. Global plan of action for animal genetic resources. FAO, Rome, Italy.
- FAO, 2012. Cryoconservation of Animal Genetic Resources; FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12; FAO: Rome, Italy.
- Gorssen W., Meyermans R., Janssens S. et al., 2021. A publicly available repository of ROH islands reveals signatures of selection in different livestock and pet species. *Genet Sel Evol* 53, 2.
- Oget C., Servin B., Palière I., 2019. Genetic diversity analysis of French goat populations reveals selective sweeps involved in their differentiation. *Anim Genet*. 50(1):54-63.
- Tosser-Klopp G., Bardou P., Bouchez O. et al., 2014. Design and characterization of a 52K SNP chip for goats. *PLoS ONE* 9, e86227.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

SAMBO : Biobanking et extraction automatisée d'ADN de microbiotes

Christian MORABITO¹

CORRESPONDANCE

christian.morabito@inrae.fr

Explorer les milliards de bactéries qui peuplent la flore intestinale - ou microbiote - de l'homme et de l'animal à des fins préventives, thérapeutiques et de nutrition : tel est l'enjeu du centre INRAE MetaGenoPolis (MGP), créé en 2012 et financé par le Programme des Investissements d'Avenir. L'expertise de MGP dans l'analyse du microbiome intestinal et de ses implications en matière de santé et de nutrition est largement reconnue dans la communauté scientifique internationale depuis 2010. MGP propose à ses partenaires d'étudier leurs questions par le biais de deux pipelines : la métagénomique quantitative, qui consiste à analyser et modéliser la diversité et la composition des microbiotes complexes, et la métagénomique fonctionnelle qui recherche des bactéries inconnues en vue de découvrir de nouveaux composés bioactifs. Ces activités s'articulent autour de 4 plateformes technologiques innovantes, dont Sambo.

Le microbiote intestinal est constitué de l'ensemble des micro-organismes vivants (archées, bactéries, eucaryotes, virus...) qui peuplent l'intestin. Il peut être considéré comme un véritable organe ayant co-évolué avec son hôte dans une relation symbiotique équilibrée, contribuant à l'homéostasie physiologique dite « eubiose ». L'avancée des recherches sur le microbiote intestinal montre à quel point cet équilibre semble être un facteur majeur pour la bonne santé d'un individu. Le déséquilibre du microbiote intestinal ou dysbiose serait au contraire associé à l'apparition de différentes pathologies chroniques.

¹ Université Paris-Saclay, INRAE, MGP, 78350, Jouy-en-Josas, France.

Description de la plateforme SAMBO

Sambo vise à créer une biobanque nationale constituée de plus d'un million d'échantillons intestinaux humains, en mesure de répondre à la demande croissante issue d'essais cliniques et de grandes cohortes épidémiologiques et nutritionnelles.

Il est le point d'entrée du pipeline de métagénomique quantitative de l'unité MGP. Ses missions consistent à :

- Expliquer aux partenaires les bonnes pratiques de collecte des échantillons, suivant les recommandations des standards internationaux IHMS (<http://www.microbiome-standards.org/>) que l'unité a contribué à élaborer.
- Réceptionner les échantillons collectés et de les conditionner de sorte à les stocker dans la biobanque de l'unité, d'une capacité de 600 000 échantillons, qui est gérée par le personnel de la plateforme.
- Réaliser une extraction d'ADN de la meilleure qualité possible pour ces échantillons, de façon à obtenir des molécules d'ADN à haut poids moléculaire, qui permettront de générer des séquences fiables (suivant les recommandations IHMS mentionnées ci-dessus).
- Développer de nouvelles applications qui permettent de diversifier le champ des possibles de l'unité et la prise en charge d'échantillons toujours plus nombreux et variés.

Pour réaliser ces missions, SAMBO s'est doté d'un laboratoire confiné de type P2 ainsi que de trois automates : une biobanque automatisée à - 80 °C, un robot de purification d'ADN et enfin, un robot de pipetage et de quantification.

Chaîne de robots de la plateforme SAMBO

Biobanque (Figure 1)

Après conditionnement en tubes ou boîtes compatibles, les échantillons reçus sont positionnés dans le magasin (1) de la biobanque. Une nacelle située à l'intérieur de la machine (a) vient chercher les échantillons pour les positionner dans un scanner qui identifie les codes-barres des tubes, boîtes et plaques (2), puis dans un module de picking (3 et b) où ils seront réorganisés sur de larges racks à haute densité. Ils sont ensuite déposés dans un espace de stockage à - 80 °C (c). Toute l'opération est pilotable à distance. La biobanque est sécurisée par un doublement des systèmes assurant le froid ainsi que par une cuve d'azote liquide de secours et d'onduleurs.



Figure 1. Processus de stockage des échantillons dans la biobanque.

Robot de purification (Figure 2)

Les échantillons à extraire subissent une lyse thermique, chimique et mécanique selon une méthode manuelle issue des standards IHMS. Les lysats générés sont pris en charge par le QIASymphony SP de la société QIAGEN, qui peut générer jusqu'à 96 purifications à la fois. Cet automate utilise la technique bien connue de purification avec des billes magnétiques ; brièvement, l'ADN contenu dans le lysat s'accroche à une suspension de billes magnétiques, qui sont ensuite retirées à l'aide d'un aimant et éluées dans un tampon. L'automate est composé d'un portoir pour les tubes de lysats (1), d'une tête de pipetage (2), de portoirs pour racks de cônes (3), d'un emplacement pour cartouches de réactifs (4), d'un plateau de travail équipé de têtes aimantées (5), d'un espace pour consommables de travail (6) et enfin, d'un portoir à plaques au format SBS (7).



Figure 2. Automate de purification QIASymphony SP.

Robot de pipetage et de quantification (Figure 3)

Après purification de l'ADN, les échantillons produits en rack Matrix 96 tubes peuvent être quantifiés par fluorimétrie en utilisant le robot de pipetage Biomek 4000 (Beckman Coulter), couplé à un lecteur en plaque Filtermax (Molecular De-

vices), avant mise à disposition de la plateforme MetaQuant de MGP pour séquençage. Cet automate peut également transférer les échantillons en plaques PCR pour envoi au partenaire ou à son prestataire externe de séquençage si nécessaire. Le robot est composé d'un plateau de travail (1), d'un boucheur-déboucheur de tubes (2), d'un fluorimètre en plaque (3) d'un bras de pipetage avec plusieurs têtes (4) et d'un lecteur de code-barres en plaque (5).

Perspectives

SAMBO souhaite augmenter sa force de frappe en inaugurant, début 2022, un nouveau pipeline totalement automatisé dit « haut débit » pour l'extraction d'ADN. Ce pipeline s'appuierait sur deux nouvelles machines de pipetage et d'extraction, soutenues par du petit équipement et par le Biomek 4000. L'objectif est de permettre de traiter des projets à grand volume d'échantillons (plusieurs milliers, voire dizaines de milliers) avec une capacité de 96 extractions par jour, soit 6 fois plus que le pipeline standardisé actuel. Les 2 pipelines, le nouveau et l'ancien, cohabiteraient sur la plateforme. ■

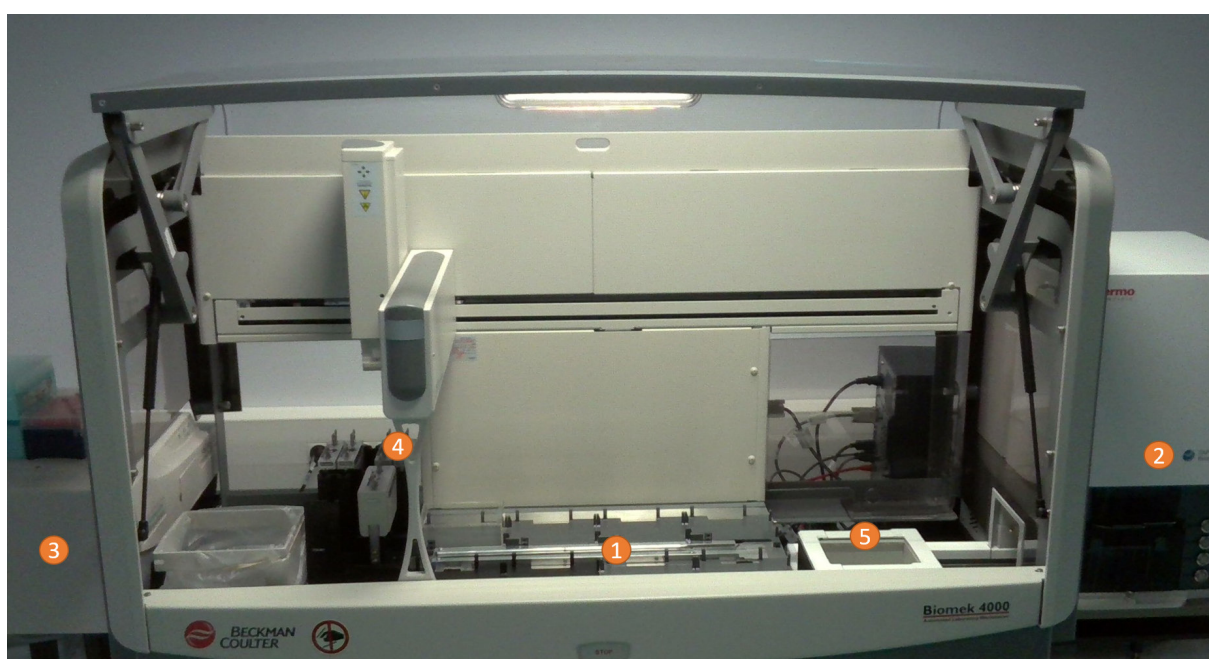


Figure 3. Automate de pipetage et de quantification Biomek 4000.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Les outils de suivi de la relation client d'un Centre de Ressources Biologiques

Victoria CHUAT¹
Florence VALENCE¹

CORRESPONDANCE

cirm-bia@inrae.fr

RÉSUMÉ

Au même titre que n'importe quelle organisation qui livre des biens ou des services à des clients, les Centres de Ressources Biologiques (CRB) doivent déployer des outils qui leur permettent de suivre et de gérer au mieux la relation avec leurs clients. Nous avons regroupé ces outils en quatre grandes catégories : les outils de communication pour faire la promotion des activités du CRB, les outils administratifs pour suivre la demande de ressource ou de service, les outils réglementaires qui garantissent que les produits et/ou les services délivrés répondent bien à la réglementation en vigueur et, enfin, les outils de recueil des besoins et de la satisfaction. Ces outils doivent être adaptés à chaque CRB, c'est-à-dire être en adéquation avec la taille du CRB considéré et avec sa stratégie de diffusion. Il existe peu d'outils spécifiques aux CRB, charge à ces derniers de trouver, parmi les outils existants, les plus pertinents, de les adapter ou encore d'en développer des spécifiques. Les normes ISO9001 et 20387, mais également les lignes directrices de l'OCDE relatives aux CRB sont une source d'information précieuse sur les prérequis de ces outils et sur leur finalité, et peuvent guider les CRB dans le choix et la mise en place de ces derniers.

MOTS-CLÉS

Relation Client, outils, satisfaction, communication, réglementation, CRB.

¹ CIRM-BIA, STLO, INRAE, Agrocampus Ouest, 35000 Rennes, France

Tracking tools and Biological Resource Center client relations

Victoria CHUAT¹
Florence VALENCE²

CORRESPONDENCE

cirm-bia@inrae.fr

ABSTRACT

As well as any organization that delivers goods or services to clients, Biological Resource Centers (BRCs) must mobilize tools in order to monitor and manage their relationship with their clients. We have grouped these tools into four main categories: communication tools that allow the BRC to promote its activities, administrative tools that allow the BRC to follow up on the request for a resource and/or service, regulatory tools that guarantee that the products and/or services delivered comply with the regulations in force and finally the tools for collecting customer needs and satisfaction. These tools must be adapted to each BRC, i.e. in line with the size of the BRC considered and its dissemination strategy. There are few tools specific to BRCs; it is up to them to find the most relevant ones among the existing tools, to adapt them or to develop specific ones. The ISO9001 and 20387 standards, as well as the OECD guidelines on BRCs, are a valuable source of information on the prerequisites of these tools and their purpose and help BRCs for choice and implementation of these tools.

KEYWORDS

Client relations, tools, satisfaction, communication, regulation, BRC.

¹ CIRM-BIA, STLO, INRAE, Agrocampus Ouest, 35000 Rennes, France

Qu'entend-on par relation client au sein d'un CRB ?

Le terme relation implique qu'il y ait un lien entre les clients et le CRB, ce qui nécessite pour bien l'appréhender de définir préalablement la nature des clients. Parler de clients signifie implicitement que le CRB délivre un bien ou un service, cela nécessite donc de définir également la nature des biens ou des services qui peuvent être délivrés par ce dernier.

Si l'on se réfère aux définitions du Larousse et des normes ISO 9001 et ISO 20387, le terme client signifie « *personne qui reçoit d'une entreprise, contre paiement, des fournitures commerciales ou des services* » et « *personne ou organisme qui est susceptible de recevoir ou qui reçoit un produit un service destiné à, ou demandé par, cette personne ou cet organisme* » respectivement. Dans le cadre d'un CRB les fournitures sont représentées par des ressources biologiques d'une extrême diversité : micro-organismes, semences végétales et animales, prélèvements humains, échantillons d'ADN, arbres... En ce qui concerne les services, ils sont, eux aussi, extrêmement divers : identification et caractérisation de matériel biologique, conservation, expertise, formation... De cette diversité découle une très grande diversité de clients : chercheurs académiques et privés, scientifiques INRAE et hors INRAE, de toutes nationalités, entreprises, centres techniques et de références associés au domaine d'application des ressources considérées, enseignement, particuliers... Cela étant, les liens qui relient le client au CRB sont identiques. Le terme client induisant implicitement une notion de rétribution, ce qui n'est pas systématiquement le cas dans le cadre de l'activité de CRB, nous utiliserons dans la suite de cet article le terme d'utilisateurs pour faire référence aux clients des CRB.

Dans le cas qui nous intéresse, la relation client consiste donc à mettre en œuvre des outils afin de créer et d'entretenir une relation réciproquement bénéfique entre le CRB et ses utilisateurs ; l'objectif étant d'apporter de la valeur ajoutée aux utilisateurs, mais aussi de garantir le bon déroulement de la mise à disposition des ressources biologiques ou des services, dans le respect de la réglementation et de la législation.

Quels outils ? Pour quoi faire ?

Si l'on se réfère à la définition de l'OCDE (2007), les CRB ont pour vocation de conserver la biodiversité, de sécuriser des ressources biologiques de référence, de mettre à disposition ces ressources à des fins de recherche et dévelop-

pement et d'avoir une activité de recherche et développement. Si, comme évoqué précédemment, la diversité des ressources est très vaste, la mise à disposition répond aux mêmes impératifs. Il en va de même pour l'offre de services associée qui, bien qu'extrêmement diverse elle aussi, repose sur un schéma commun. De ce fait, les outils seront globalement les mêmes quel que soit le type de ressources hébergées par le CRB. Par outils, nous entendons aussi bien des trames documentaires, des logiciels, des tableurs que des procédures.

L'utilisateur doit en tout premier lieu savoir que le CRB existe ; ensuite : quelle est la nature précise des ressources biologiques distribuées et des services réalisés, quelles sont les modalités d'accès à ces derniers (conditions légales et réglementaires, tarification), comment faire part de son besoin et de sa satisfaction avant, pendant et après la distribution des ressources ou du service et, enfin, où en est sa demande. Pour répondre à ces objectifs, il est essentiel d'utiliser des outils adaptés et pertinents. Ces outils doivent permettre à l'utilisateur de communiquer avec le CRB, de la demande jusqu'à la distribution de la ressource ou la réalisation du service. Ils doivent également fournir un support documenté pour les échanges d'informations relatives à la demande de ressource ou de service. Quatre catégories d'outils peuvent ainsi être mobilisés : 1) des outils de communication, 2) des outils administratifs, 3) des outils réglementaires et, enfin, 4) des outils pour le recueil des besoins et de la satisfaction des utilisateurs.

Les outils

Outils de communication

Les outils de communication sont essentiels pour permettre au CRB d'être visible des utilisateurs potentiels, communiquer sur les ressources qu'il héberge et les différents services qu'il peut réaliser, les modalités d'accès à ses ressources et services, etc.

Site Web et Catalogue en ligne

Le développement d'un site web adapté est un premier outil « d'accroche » qui permet de communiquer avec les utilisateurs potentiels. Il permet à ces derniers de trouver les informations importantes relatives aux ressources et services que le CRB délivre (modalités d'accès, réglementation en vigueur, tarification, nom des personnes contacts...). Il doit être adapté aux besoins du CRB et au profil des utilisateurs et être mis à jour régulièrement. Il existe à INRAE des outils institutionnels (sites clés en main EzPublish, EzPlateforme) qui peuvent répondre de manière tout à fait satisfaisante

à ces besoins. La structure du site WEB, sa mise en forme et son contenu peuvent être extrêmement variables, car ils relèvent d'une stratégie de communication qui est propre à chaque CRB, et qui dépend également de ses utilisateurs.

De plus, et en fonction du type de ressources hébergées, le site web peut être également un moyen pour le CRB de donner accès à ses ressources via un catalogue en ligne. Le choix des informations, relatives aux ressources, accessibles sur ce catalogue sont, là encore, très dépendantes du type de CRB concerné et de la nature de ses utilisateurs. Usuellement, les catalogues en ligne permettent d'accéder aux données dites minimales (OCDE, 2007). Le vocabulaire en lien avec ces données doit être, tant que faire se peut, normalisé pour assurer une cohérence entre les CRB au niveau de la recherche et de l'extraction des données. Les données minimales doivent permettre d'identifier de manière univoque l'échantillon biologique et permettre de savoir s'il répond aux exigences réglementaires qui lui sont associées (donnée d'identification, d'origine et date de collecte/mise en collection). Au-delà des données minimales, la décision de donner accès à des données complémentaires (données de phénotypes, caractères/particularités spécifiques) relève d'un choix stratégique de chaque CRB au regard de ses ressources et de ses utilisateurs.

Dans sa version la plus simple, le catalogue en ligne peut permettre aux utilisateurs de savoir quelles sont les ressources auxquelles il peut accéder. Mais le catalogue peut également permettre aux utilisateurs de commander les ressources en ligne. Là encore, les fonctionnalités du catalogue relèvent d'un choix stratégique de chaque CRB au regard de ses ressources et de ses utilisateurs.

Le développement d'un catalogue en ligne requiert d'avoir une base de données interrogeable et donc un format de données spécifiques. Un catalogue en ligne peut être développé à façon mais nécessite l'intervention d'un informaticien pour le développement, les évolutions et la maintenance. Il existe également des solutions généralistes open source ou commerciales (Filemaker, SQLite, MySQL,...) mais qui nécessitent d'être adaptées pour gérer des données spécifiques aux CRB. Enfin, il existe des solutions commerciales spécifiques à la gestion des ressources biologiques, la base de données BioAware (<https://www.bio-aware.com/page/home>) avec son catalogue en ligne Biolomics en est un exemple et équipe aujourd'hui 7 CRB de l'infrastructure RARe.

Communications écrites, orales et affichées

La promotion des ressources et activités du CRB peut également se faire via des communications orales ou affichées

lors de séminaires ou de colloques professionnels et scientifiques, fréquentés par les utilisateurs potentiels des ressources hébergées. Les communications peuvent porter sur l'activité générique du CRB et les services qu'il offre (communications généralement effectuées par un représentant du CRB), mais également sur la mise en valeur de travaux de recherche réalisés sur les ressources du CRB (communications réalisées par le/les utilisateur(s) des ressources). De la même manière, la promotion des ressources/services du CRB peut passer par la publication d'articles dans des revues techniques ou professionnelles, mais également par des articles scientifiques qui mettent en avant les ressources/services du CRB mobilisés par les utilisateurs. Dès lors, on voit qu'il est important que les ressources biologiques/services soient clairement reliés au CRB. Il est primordial que les ressources utilisées soient citées par l'identifiant unique attribué par le CRB d'appartenance. De même, lors de la délivrance des ressources/services, le CRB peut demander expressément d'être cité, par exemple dans les remerciements ou, en fonction de la contribution aux travaux de recherche, dans les auteurs de la communication/publication. Pour améliorer la visibilité du CRB, une demande de DOI (digital object identifier) peut être faite. Le numéro DOI est un identifiant numérique qui permet au CRB d'être identifié, référencé et cité de manière unique, en l'associant à des métadonnées qui le caractérisent. La demande de DOI peut se faire auprès de la Commission Nationale des Unités expérimentales (CNUE), service dédié aux structures de recherche uniquement labellisées ISC. Cependant, face à la demande croissante, des discussions sont en cours au niveau d'INRAE pour apporter une offre adaptée à toutes les structures, hors ISC.

Réseaux

Un autre moyen d'améliorer la visibilité du CRB consiste à intégrer des réseaux de collections nationaux et/ou internationaux. Ces réseaux offrent généralement une vitrine numérique sur les ressources/services du CRB. Ils sont en général spécifiques au type de ressources hébergées par le CRB et peuvent afficher les ressources du CRB dans un catalogue en ligne dédié. C'est le cas, par exemple, pour les ressources microbiennes de la World Federation of Culture Collection (WFCC, <http://www.wfcc.info/index.php/home/>). Cette organisation recense, à ce jour, 131 collections de microorganismes issues de 49 pays. Les ressources de ces collections sont accessibles et consultables sur un catalogue en ligne qui regroupe plus de 480 000 accessions. On peut également citer, pour les ressources végétales, l'European Search Catalogue for Plant Genetic Resources (EURISCO ; <https://eurisco.ipk-gatersleben.de>) qui recense

au niveau européen les ressources phylogénétiques destinées à la recherche, et qui fournit des informations sur plus de 2 millions d'accessions de plantes cultivées et de leurs parents sauvages, préservés *ex situ* par près de 400 instituts. On peut également citer, pour les ressources génétiques, le Global Genome Biodiversity Network (GGBN ; <http://www.ggbn.org>), un réseau international constitué de 95 membres, qui recouvre plus de 5,7 millions d'accessions. Outre ces réseaux spécifiques à une catégorie de ressources, il existe des infrastructures telles que l'infrastructure nationale des CRB Agronomiques RARe qui rassemble cinq réseaux de CRB conservant les ressources génétiques, génomiques et biologiques issues de la recherche sur les animaux domestiques, les plantes modèles ou cultivées, les espèces sauvages apparentées aux espèces domestiques, les arbres forestiers, les micro-organismes d'intérêt agronomique ou agro-alimentaire, les micro-organismes et organismes de l'environnement. Cette infrastructure regroupe plus de 30 CRB qui relèvent de différentes tutelles (INRAE, CIRAD, IRD, CNRS) ; elle offre, par le biais de ses différentes actions, le moyen d'améliorer la visibilité française des ressources biologiques hébergées par les CRB qui la constituent et de faciliter leur utilisation par un grand nombre de chercheurs, de la communauté agronomique comme d'autres communautés, au niveau national comme européen.

Autres supports

Enfin, tous les outils usuels de communication non numériques (dépliant, plaquette, flyer, brochure, affiches...) peuvent être utilisés. Ces médias dits « palpables » facilitent la mémorisation des informations, l'imprimé étant désormais considéré comme un complément à part entière du numérique. Il peut être utilisé comme un « média d'appel » pour attirer l'attention de l'utilisateur et l'orienter vers le site web. Le type de support, qui relève de la stratégie de communication du CRB, devra être choisi au regard du profil des utilisateurs et des moyens de diffusion.

Outils administratifs

Ces outils doivent permettre de garantir que la distribution de la ressource ou du service satisfait aux prescriptions spécifiques requises par les réglementations nationales et internationales applicables ; ainsi, une commande ne peut être acceptée si tous les documents qui doivent l'accompagner n'ont pas été complétés, signés et renvoyés. Le principe de confidentialité doit être respecté et s'applique à toutes les demandes de distribution de ressources ou de services. Certaines données collectées auprès des utilisateurs

peuvent être utilisées pour produire des statistiques sur les activités du CRB, mais sans possibilité d'identification du client, et doivent respecter la réglementation relative à la gestion des données personnelles, en accord avec la réglementation nationale et européenne en vigueur.

La mise en place d'outils administratifs permet un meilleur suivi des demandes des utilisateurs et facilite la communication avec ces derniers.

Parmi ces outils, nous pouvons distinguer : 1/ les outils qui sont diffusés auprès des utilisateurs et qui permettent de renseigner et de valider les différentes étapes de sa demande et 2/ les outils uniquement destinés au CRB pour la bonne gestion du suivi de la demande utilisateur. Ces derniers devront être adaptés aux modalités de fonctionnement, au nombre de sollicitations et au type de ressources du CRB considéré. Les tableaux 1 et 2 détaillent les outils les plus fréquemment rencontrés. Il est possible que l'activité de certains CRB requiert des outils plus spécifiques qui seront alors à développer à façon par le CRB.

Outils réglementaires liés à la gestion des ressources et des données

Outils réglementaires liés à la gestion des ressources

Dans le cas de la diffusion de ressources biologiques, le CRB doit fournir à minima les informations suivantes aux utilisateurs des ressources : l'identifiant de la ressource et son numéro de lot, les instructions relatives à sa mise en œuvre, une fiche signalétique de sécurité le cas échéant, un accord de transfert de matériel et éventuellement une fiche d'accusé de réception du matériel (lignes directrices OCDE).

La distribution, l'utilisation et le dépôt des ressources biologiques sont réglementés à différents niveaux : international, européen ou encore national. Ces réglementations peuvent être d'ordre très général, comme la réglementation liée à la loi sur l'accès au partage des avantages pour les ressources biologiques (<https://absch.cbd.int/>), ou très spécifique selon la nature des ressources considérées comme, par exemple, les ressources relevant de la réglementation sur les organismes génétiquement modifiés, les ressources relevant du Traité International sur les Ressources Phylogénétiques pour l'Alimentation et l'Agriculture (TIRPAA) ou les organismes à double usage ou de quarantaine.

Les points de vigilance ne sont donc pas les mêmes selon les ressources et selon l'utilisation qui en sera faite par l'utilisateur (diffusion ou non, recherche académique, recherche et développement...). Les différents outils mis en œuvre doivent permettre de spécifier aux utilisateurs, de manière

Tableau 1 : Outils administratifs à destination du client

DOCUMENTS	DESCRIPTIFS	SUPPORTS
Conditions tarifaires	Il est nécessaire d'établir un document qui affiche sans ambiguïté les conditions tarifaires pour tous les services proposés, qu'il concerne la diffusion de ressources ou la réalisation de prestations de services. Ces conditions tarifaires doivent faire l'objet d'une mise à jour régulière et respecter les règles institutionnelles dictées par la/les tutelle(s).	Établi selon la trame documentaire du CRB, dans le respect des règles établies par les tutelles. Peut être affiché sur le site WEB, catalogue en ligne ou fourni à la demande.
Devis	Dans le cas de demande d'accès ou de prestations spécifiques, la demande de l'utilisateur peut nécessiter d'établir un devis. Il devra détailler les services fournis à l'utilisateur et leur coût. L'établissement du devis doit respecter les règles institutionnelles dictées par la/les tutelle(s). Un accord formel sur devis est nécessaire pour pouvoir délivrer le service.	Établi selon la trame documentaire du CRB, dans le respect des règles établies par les tutelles. Confidentiel.
Bon de commande	Le bon de commande permet de valider officiellement la demande du client, les tarifs en vigueur, les prestations demandées.	Cela peut être la trame de bon de commande du CRB ou un bon de commande édité par le client. Dans tous les cas, le tampon de l'entreprise et une signature du client devra être présente pour faciliter la facturation, ainsi que les numéros SIRET/SIREN/ TVA au besoin. Confidentiel.
Bon de livraison	Dans le cas de la diffusion de ressources biologiques, un bon de livraison accompagnera ces dernières, précisant la liste détaillée des ressources délivrées, le montant global de la commande, les dates d'envoi, les adresses de facturation et de livraison ...	Établi selon la trame documentaire du CRB, dans le respect des règles établies par les tutelles. Confidentiel.
Rapport de prestations	Dans le cas d'une prestation de service, le rapport permettra de formaliser et de rendre compte de la prestation réalisée. Le niveau de détail du rapport de prestation relève d'un choix propre à chaque CRB en concertation avec ses utilisateurs, la finalité étant que ces derniers soient satisfaits du service rendu.	Établi selon la trame documentaire du CRB. Confidentiel.
Facture	La facture reprend, pour le client, la description du service réalisé (diffusion de souches, prestations de service). Elle indique le montant total ainsi que la procédure et les coordonnées bancaires pour régulariser ladite facture.	Établi par le CRB ou le gestionnaire de l'Institut dont il dépend. Confidentiel.

Tableau 2 : Outils administratifs à destination du CRB

DOCUMENTS	DESCRIPTIFS	SUPPORTS
Fichier de suivi des demandes	Dans le cas de diffusion de souches, prestations de services, dépôts de souches, le CRB doit disposer d'un outil de suivi des diffusions et/ou des services réalisés. Ce dernier peut être au format papier ou numérique. Il reprend à minima les coordonnées du client, la nature de la demande, les dates de suivi et le montant facturé, auxquels s'ajouteront toutes informations que le CRB jugera utiles au bon suivi et à la réalisation de la demande. Une codification peut être mise en place pour un suivi rapide des services délivrés. Cette codification doit idéalement apparaître sur l'ensemble des documents diffusés auprès des utilisateurs (bon de commande, devis, bon de livraison, facture...) pour permettre un suivi efficace de toutes les étapes, de la demande jusqu'à sa facturation. Exemple : <ul style="list-style-type: none"> • RB-2020-19 : diffusion de Ressources Biologiques - en 2020 - N°19. • PS-2020-2 : Prestation de Service - en 2020 - N°2 NB 1 : Il peut être intéressant, pour le CRB, de tracer aussi les demandes n'ayant pas abouti, ainsi que les raisons du non-aboutissement, dans un but d'amélioration des services. NB 2 : Ce suivi interne facilitera les bilans demandés dans le cadre d'une démarche qualité ou le suivi des indicateurs requis par certaines instances (CNOC, IBISA, RARe, MESRI, ...).	Établi selon la trame documentaire du CRB, dans le respect des règles établies par les tutelles. Peut être affiché sur le site WEB, catalogue en ligne ou fourni à la demande.
Outil de planification	La mise à disposition de la ressource ou la réalisation du service doit être planifiée en intégrant à la fois la disponibilité du personnel et celle des équipements.	Format numérique ou papier. Tableur de type Excel. Enregistrement au format papier ou informatique, logiciels spécifiques (AQ tool, GMAO, Gantt...).
Fichier de suivi de la satisfaction clients	Dans une démarche d'amélioration continue et plus globalement d'une démarche qualité, il est nécessaire d'évaluer la satisfaction du client. C'est une obligation pour les CRB certifiés selon les normes ISO-9001 et/ou ISO-20387. Le suivi de la satisfaction client peut s'effectuer via le fichier de suivi des demandes utilisateur mentionné ci-dessus ou bien faire l'objet d'un suivi spécifique dans un fichier dédié. Voir § Outils pour le recueil des besoins des clients et l'évaluation de leur satisfaction.	Établi selon la trame documentaire du CRB. Confidentiel.

claire, les règles en vigueur et garantir que ces règles soient respectées. La figure 1 reprend, de manière non exhaustive, les principaux types de documents qui peuvent être mis à disposition ou échangés avec les utilisateurs pour garantir le respect de la réglementation en vigueur et la bonne gestion de la propriété intellectuelle associée aux ressources distribuées ou déposées dans le CRB. À ces documents, peuvent s'ajouter des documents spécifiques à certains types de ressources biologiques, à charge pour chaque CRB de bien connaître, via une veille réglementaire adaptée, la réglementation en vigueur concernant les ressources qu'il héberge et distribue.

Cas particulier du Material Transfert Agreement (MTA)

selon les prescriptions OCDE relatives aux CRB, aucun échange de matériel biologique ne peut se faire sans émission d'un MTA, condition essentielle pour protéger les droits de propriété intellectuelle et obligatoire si la loi l'exige. Ces accords sont utilisés pour relayer les prescriptions du dépositaire, du propriétaire de ressources et/ou du pays d'origine concernant l'utilisation de la ressource. Le MTA spécifie, pour les ressources considérées, qui en est le propriétaire et/ou dépositaire. Il indique les coordonnées du demandeur et de la structure dont il dépend. L'utilisation devant être faite sur la/les ressource(s) doit être spécifiée clairement ainsi que les contraintes et limites d'utilisation. Pour les ressources microbiennes, un core-MTA est disponible sur le site de l'European Culture Collection Organization (<https://www.eccosite.org/ecco-core-mta/>). Mais il existe également des trames institutionnelles. INRAE a ainsi mis à disposition des CRB et utilisateurs des ressources biolo-

giques deux versions modèles de MTA, une française et une anglaise à l'adresse suivante : <https://sites.inrae.fr/site/maj/APA/SitePages/Documents-types.aspx>.

Dans certains cas de partenariats ou de collaborations de recherche avec des partenaires académiques et/ou privés, mobilisant un nombre important de ressources ou qui requièrent des modalités de mise en œuvre particulières, la diffusion des ressources peut faire l'objet d'une contractualisation spécifique (Contrat de partenariat, contrat de criblage, accord de consortium...). À charge pour le CRB de se rapprocher des services juridiques et/ou de partenariat relatifs à sa tutelle de rattachement pour contractualiser le partenariat.

Outils Réglementaires liés à la gestion des données

Le terme « données », dans le cadre d'une activité de CRB, recouvre : i) la documentation qualité utile au bon fonctionnement des activités du CRB et à une bonne traçabilité (Processus, Procédure, Mode-Opératoire, Enregistrement...); ii) les données décrivant les ressources biologiques hébergées et leurs origines; iii) les données personnelles concernant les utilisateurs des ressources et/ou de services et, enfin, iv) les données liées au management des ressources humaines du CRB. Dans le cadre des outils liés à la relation client, nous détaillerons uniquement les données « utilisateurs ».

Pour le bon suivi des diffusions de ressources biologiques et prestations de services, le CRB est amené à collecter diverses informations dites « sensibles ». Il s'agit de données relatives à l'identité de l'utilisateur (civilité, nom, prénom,



Figure 1. Exemples de documents nécessaires à la gestion des ressources biologiques, de leur acquisition à leur diffusion et valorisation.

adresse, numéro de téléphone, adresse électronique, adresse de livraison...), mais aussi des données relatives aux paiements, comme les coordonnées bancaires ou l'adresse de facturation. À ce titre, les CRB doivent répondre aux exigences de la commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL), en respectant le règlement général sur la protection des données (RGPD) et en mettant en place un plan de gestion des données personnelles. Pour se faire, les CRB peuvent s'appuyer au niveau institutionnel sur leur référent CNIL. À INRAE, une page WEB (<https://intranet.inrae.fr/donnees-personnelles/>) est spécifiquement dédiée à la gestion des données personnelles et propose un certain nombre d'outils et de documents pour se mettre en conformité.

Outils pour le recueil des besoins utilisateur et l'évaluation de sa satisfaction

Les CRB distribuant des biens et des services se doivent, dans un premier temps, de déterminer quels sont les besoins de leurs utilisateurs et, ensuite, de s'assurer de leur satisfaction, une fois les ressources délivrées ou le service réalisé.

Recueillir les besoins

La première étape consiste à bien définir les besoins de ses utilisateurs. Nous distinguons 4 types de besoins : le besoin exprimé (explicite), le besoin légal, le besoin implicite et le besoin induit. Si les deux premiers sont assez simples à définir et à recueillir, les deux derniers sont, en revanche, plus difficiles à prendre en compte, car ils ne sont pas clairement exprimés.

- **Le besoin exprimé** : facile à prendre en compte, car est clairement défini par l'utilisateur. Par exemple, la commande d'une ressource appartenant à une espèce en particulier ou issue d'un biotope donné ou encore pour une demande de service : le rendu des résultats sous 2 semaines.
- **Le besoin légal** répond à une contrainte réglementaire en vigueur. Par exemple, la ressource a été collectée dans le respect de la réglementation internationale (Protocole de Nagoya) ou encore le CRB respecte la confidentialité des résultats ou de la ressource diffusée.
- **Le besoin implicite**. Il est évident pour l'utilisateur, mais n'est pas exprimé par ce dernier. Par exemple, un conditionnement adapté à la ressource biologique diffusée ou l'aide à l'interprétation des résultats dans le cadre d'une prestation de services.
- **Le besoin induit** est créé par le CRB et devient une attente pour l'utilisateur. Par exemple, une notice de

remise en culture ou d'utilisation fournie par le CRB et qui accompagne la ressource diffusée ou encore la conservation des échantillons après une prestation pour d'éventuelles analyses complémentaires.

Ces besoins peuvent être recueillis à différents niveaux :

- Directement lors de la prise de contact de l'utilisateur pour une demande spécifique de ressource biologique ou de service. Cela peut permettre de cerner, à ce moment-là, tous les besoins de l'utilisateur afin d'atteindre sa pleine satisfaction.
- En amont d'une demande, à tous les contacts du CRB, par le biais d'une enquête de besoins. Cela peut permettre de prendre connaissance de demandes futures et ainsi pouvoir mieux planifier les activités du CRB, ou de découvrir des besoins qui n'ont pas encore été identifiés. Par exemple, une catégorie de RB non présente dans le CRB, un type de conditionnement spécifique ou encore un besoin pour une prestation qui n'est pas encore proposée par le CRB.

Le plus difficile est sans doute de recueillir les besoins d'utilisateurs potentiels qui n'ont pas encore sollicité le CRB et pour lesquels nous n'avons pas les contacts. Le réseau professionnel prend ici toute son importance. En effet, la participation à des réseaux métiers, à des congrès et séminaires peut permettre d'identifier ces utilisateurs potentiels et éventuellement de les interroger sur leurs besoins.

Les outils pour recueillir les besoins peuvent être assez simples. Il peut s'agir d'enquêtes formelles, sous forme papier, électronique, téléphonique, ou encore informelles lors, par exemple, de réunions de travail ou de séminaires. L'enjeu réside dans la construction de ces enquêtes, quel qu'en soit le support, pour recueillir de manière exhaustive l'ensemble des besoins de l'utilisateur, y compris les besoins implicites. Le recueil de ces besoins devra être formalisé et enregistré par le CRB.

Évaluer la satisfaction

Que l'on soit ou non certifié, suivre la satisfaction des utilisateurs permet d'être dans une démarche d'amélioration continue. Il s'agit ici d'évaluer la satisfaction de l'utilisateur après la diffusion de ressources biologiques ou la réalisation d'un service. Si l'utilisateur se dit satisfait c'est que l'ensemble de ses besoins a bien été perçu et pris en compte. L'évaluation de la satisfaction client est un impératif de la norme ISO-9001:2015. Ainsi, selon le paragraphe 9.1.2 de cette norme « *L'organisme doit surveiller la perception des clients sur le niveau de satisfaction de leurs besoins et attentes. L'organisme doit déterminer les méthodes permettant d'obtenir, de surveiller et de revoir ces informations* ».

Les méthodes permettant de recueillir cette satisfaction sont diverses. Le recueil peut se faire sous forme d'enquêtes (papier, e-mail, questionnaires en ligne, enquête téléphonique), mais également par le biais de rencontres avec les utilisateurs (réunions d'utilisateurs, séminaires...). Là encore, le recueil de la cette satisfaction client devra être formalisé et enregistré par le CRB.

Suite au recueil de cette satisfaction, le CRB devra trouver l'outil qui, en fonction de sa taille, son organisation, la typologie de ses utilisateurs, lui permettra un suivi efficace de la satisfaction de ses utilisateurs. Cet outil devra permettre une traçabilité de tous les échanges entre le CRB et ses utilisateurs et des décisions prises et actions mises en œuvre suite au retour de la satisfaction client. Il existe, à ce jour, plusieurs outils plus ou moins spécifiques : tableurs, logiciels commerciaux tels que MANTIS ou des outils qualité développés par des unités CIRAD ou INRAE comme AQ-Tool ou Gimaco. (http://golo.cirad.fr/FR/CRB_T_AQTools.awp ; <http://cnrgv.toulouse.inra.fr/fr/Equipement/Ressources-informatiques/Au-sujet-de-GIMACO>).

Gérer les éventuelles réclamations

Malgré tout le soin pris par le CRB à satisfaire au mieux les besoins de ses utilisateurs, il peut arriver qu'il y ait des réclamations. Que ce soit la norme ISO 9001 ou les recommandations de l'OCDE, toutes exigent la prise en compte et le suivi de ces réclamations. Ainsi, selon les Lignes directrices de l'OCDE relatives aux pratiques exemplaires concernant les CRB, « *le CRB doit tenir un registre de toutes les questions ou plaintes des utilisateurs et, dans toute la mesure du possible, en accuser réception par retour ou le jour même par télécopie, téléphone ou courrier électronique* » (paragraphe 12.7.1) et « *le CRB doit*

étudier les plaintes dès réception et mettre en œuvre les actions correctives nécessaires. Toutes les plaintes doivent être prises en compte dans des analyses de tendances effectuées de façon régulière » (paragraphe 12.7.2). Tout comme pour le suivi de la satisfaction client, le CRB devra trouver l'outil adapté, les outils possibles étant globalement les mêmes que ceux cités précédemment.

Conclusion

Les moyens de communiquer et d'échanger des informations avec les utilisateurs des ressources et/ou des services délivrés par les CRB sont nombreux. La grande majorité de ces moyens sont génériques et ne sont pas liés à la nature des ressources biologiques et/ou des services délivrés ni même au « métier » de CRB. Pour être réellement utiles et fonctionnels, ils doivent être choisis avec pertinence et éventuellement adaptés à l'activité de chaque CRB. Cela demande en prérequis que les CRB aient clairement défini leur stratégie de diffusion des ressources et/ou de services, mais également qu'ils aient bien identifié la nature de leurs utilisateurs. S'il n'y pas de règle consensuelle quant au choix de ces outils, l'application des principes relatifs à la norme ISO 9001 ou ISO 20387 ainsi que les lignes directrices de l'OCDE relatives aux pratiques exemplaires concernant les centres de ressources biologiques sont une aide précieuse pour le choix et la hiérarchisation de ces outils. Sont également disponibles, auprès des Instituts auxquels sont rattachés les CRB, des outils WEB, des trames des bases documentaires qui peuvent considérablement aider les CRB dans le déploiement des outils de suivi de la relation client. ■

Abréviations

ABSCH : Access and Benefit-Sharing Clearing-House

CNIL : Commission nationale de l'informatique et des libertés

CNOC : Commission Nationale des Outils Collectifs

CNUE : Commission Nationale des Unités Expérimentales

CRB : Centre de Ressources Biologiques

DOI : Digital Object Identifier

GMAO : Gestion de Maintenance Assistée par Ordinateur

IBISA : Infrastructure en Biologie, Santé et Agronomie

ISC : Infrastructure Scientifique Collective

MESRI : Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation

MOT : Micro-Organismes et Toxines hautement pathogènes

MTA : Materiel Transfert Agreement

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

TIRPAA : Traité International sur les Ressources Phytogénétiques pour l'Alimentation et l'Agriculture

RARe : Ressources Agronomiques pour la Recherche

RGPD : Règlement Général sur la Protection des Données

Références

AqTools. http://golo.cirad.fr/FR/CRB_T_AQTools.awp

Billé J. & Soparnot R., 2006. La gestion de la relation client ou customer relationship management, une source d'innovation : Le cas de la banque Société Générale. *La Revue des Sciences de Gestion*, 1(1), 101-110. <https://doi.org/10.3917/rsg.217.0101>.

BioAware. <https://www.bio-aware.com/page/Home>.

European Search Catalogue for Plant Genetic Resources. EURISCO : <https://eurisco.ipk-gatersleben.de>.

Gimacco. <http://cnrgv.toulouse.inra.fr/fr/Equipement/Ressources-informatiques/Au-sujet-de-GIMACO>.

Global Genome Biodiversity Network GGBN. <http://www.ggbn.org>.

LabCollector. <http://www.labcollector.com/>.

Normes ISO 9001:2015 Systèmes de management de la qualité – Exigence. <https://www.iso.org/fr/standard/62085.html>

Norme ISO 20387/2018 Biotechnologie->biobanking-> Exigences générales au « biobanking ». <https://www.iso.org/fr/standard/67888.html>.

OECD. Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres (2007) (<https://www.oecd.org/sti/emerging-tech/38777417.pdf>).

Sites EZpublish et EZplateforme. <https://www6.inrae.fr/scem-docenligne/Structurer-votre-site/Sites-cle-en-main>.

World Federation of Culture Collection. WFCC <http://www.wfcc.info/index.php/home/>



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Présentation du portail d'accès aux ressources biologiques du pilier animal de RARe

Sylvain MARTHEY¹
Aurélie DELAUAUD²
Nicolas MARTHEY³
Camille MÉAL⁴
Michèle Tixier-BOICHARD³

CORRESPONDANCE

sylvain.marthey@inrae.fr

aurelie.delavaud@fondationbiodiversite.fr

RÉSUMÉ

Le portail web <https://crb-anim.fr/access-to-collection/#> a été élaboré entre 2015 et 2017 grâce au soutien du projet Investissements d'Avenir CRB-Anim. Il permet de consulter le catalogue des collections de 5 CRBs concernant les espèces animales domestiques, de gérer les demandes d'entrée ou de sortie d'échantillons et d'accéder aux données associées. Cet article présente les étapes de la création du portail : définition des descripteurs standard, spécificités fonctionnelles et sélection d'un prestataire après appel d'offres, développement du portail, réalisation de connecteurs pour alimenter le portail. Depuis son ouverture en 2017, le portail est maintenu en amélioration continue.

MOTS-CLÉS

Système d'information, mammifères, oiseaux, poissons, coquillages, accès aux ressources génétiques.

1 Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR GABI, Jouy-en-Josas, *affiliation actuelle UR MalAGE.

2 Fondation pour la recherche sur la biodiversité (FRB), Paris.

3 Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR GABI, Jouy-en-Josas.

4 Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR GABI, Jouy-en-Josas, *affiliation actuelle US CTIG.

Presentation of the biological resource access portal of the RARe's animal division

Sylvain MARTHEY¹
Aurélié DELAUAUD²
Nicolas MARTHEY³
Camille MÉAL⁴
Michèle Tixier-BOICHARD³

CORRESPONDENCE

sylvain.marthey@inrae.fr

aurelie.delavaud@fondationbiodiversite.fr

ABSTRACT

The web portal <https://crb-anim.fr/access-to-collection/#> was developed between 2015 and 2017 thanks to support from the project Investments in the Future BRC-Anim. It allows consulting the catalogue of the collections of 5 BRCs concerning domestic animal species, managing demands for introducing and withdrawing samples, and access to associated data. This article presents the steps of developing the portal: the definition of standard descriptors, functional specificities and the selection of a service provider following a call for tenders, the development of the portal, and the creation of links to fuel the portal. The portal has been continuously improved since it was opened in 2017.

KEYWORDS

Information system, mammals, birds, fish, shellfish, access to genetic resources.

1 Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR GABI, Jouy-en-Josas, *affiliation actuelle UR MaIAGE.

2 Fondation pour la recherche sur la biodiversité (FRB), Paris.

3 Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR GABI, Jouy-en-Josas.

4 Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR GABI, Jouy-en-Josas, *affiliation actuelle US CTIG.

Introduction

Le pilier animal de RARe s'est développé à partir du projet d'infrastructure nationale en biologie et santé « CRB-Anim », lauréat du programme Investissements d'Avenir en 2011. L'appel d'offres de ce programme précisait qu'une infrastructure nationale devait avoir un guichet unique centralisant l'accès à ses services. Le projet « CRB-Anim » déposé en 2011 proposait donc de mettre en place un portail d'accès aux ressources de tous les CRBs disposant de ressources biologiques pour les animaux domestiques, dans le cadre de son WP4. L'ouverture du portail constituait un des livrables du projet, dont la réalisation est suivie par l'ANR depuis 2012. L'analyse de la diversité des systèmes d'information locaux, propres à chaque CRB, a vite conduit à la conclusion qu'il n'était pas réaliste d'imposer un même système local à chacun, l'effort à produire paraissait trop important au regard de la solution d'un portail commun, important les données « à façon » de chaque CRB. Nous nous sommes inspirés pour cela de la solution retenue par l'infrastructure Biobanques des CRBs humains, confrontée à une diversité encore plus grande des systèmes d'information locaux.

Étant donné la diversité des espèces animales et des matériels biologiques concernés, la première étape a consisté à définir les descripteurs communs qui seraient accessibles sur le portail. La deuxième étape a été de préciser les spécificités fonctionnelles et de rédiger un cahier des charges permettant la sélection d'un prestataire informatique. La troisième étape a vu le développement du portail proprement dit et de la base de données associée. La quatrième étape a consisté à développer les outils d'importation des données des CRBs individuels vers la base de données commune, accessible par le portail. Les différentes étapes ont été pilotées par Aurélie Delavaud et Sylvain Marthey et ont mobilisé plusieurs instances de l'infrastructure : son conseil de gouvernance, ses groupes d'experts par espèces, son conseil scientifique et son comité consultatif international. Le portail a été créé en code ouvert, de façon à permettre à l'infrastructure de garder la main sur les évolutions ultérieures. Le portail a été ouvert en septembre 2017 et continue d'évoluer.

Développement

Minimum data set : année 2015

L'objectif est de décrire les ressources biologiques de façon assez standardisée pour faciliter leur recherche, et de façon assez complète pour répondre aux besoins d'un nombre maximal d'utilisateurs. Cela suppose que les fournisseurs

de ressources soient capables de fournir ces informations lors de l'entrée en collection. Il y a donc un compromis à trouver entre le travail de documentation demandé au déposant d'une ressource et la richesse des données permettant d'attirer les utilisateurs. C'est pourquoi une liste très complète de descripteurs a été élaborée, mais seul un sous-ensemble limité a été rendu obligatoire à l'entrée en collection. La définition de ce référentiel de description a été réalisée :

- **En tenant compte des besoins des utilisateurs :** un document « aide au recueil des besoins fonctionnels et non fonctionnels pour la mise en place du système d'information » a été établi et renseigné par les CRBs ou les groupes espèces ayant une expérience avec des demandes d'entrées / sorties d'échantillons (IFCE, CRB CARARE des Antilles, Cani-DNA, groupe espèce Volailles). Il a été accompagné d'entretiens téléphoniques, afin de conforter la compréhension commune du projet et de préciser les besoins sur les thèmes suivants : objectifs du portail, utilisateurs et périmètre, liens avec d'autres systèmes d'information, fonctionnalités nécessaires et description du « workflow » de gestion des requêtes d'entrée ou de sortie d'échantillons, cas et exemples d'utilisation, contraintes à prendre en compte.
- **En concertation avec les groupes espèces (GE) :** une première proposition de « minimum dataset » a été transmise aux représentants des groupes espèces, puis travaillée à distance ; celle-ci a été re-travaillée avec l'ensemble des groupes espèces (Volailles, Carnivores, Poissons, Équins, Porcins, Lapins) lors de deux réunions, puis, des échanges ultérieurs spécifiques ont permis d'affiner cette liste en tenant compte des spécificités des espèces (Équins, Poissons) et d'anticiper les informations collectées par les CRBs pour l'entrée en Cryobanque nationale.
- **En tenant compte d'un standard international afin de permettre l'interopérabilité entre les systèmes d'information et le versement des échantillons dans des bases internationales :** il s'agit en particulier des pré-requis du BioSamples Database (BioSD) de l'European Bioinformatics Institute (EBI).
- **En tenant compte de la réglementation européenne qui s'applique aux CRB :** intégration des informations requises par le règlement européen n°511/2014 du parlement européen et du conseil relatif aux mesures concernant le respect par les utilisateurs dans l'Union du protocole de Nagoya sur l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages (APA) découlant de leur utilisation.
- **En tenant compte du profil de métadonnées⁹**

9 Entendues ici comme les informations décrivant une ressource (un jeu de données, une collection...) : qui, quoi, où, quand, comment, pourquoi.

RGscope / ECOSCOPE (devenu depuis Pôle National de Données sur la Biodiversité, PNDB) afin de permettre l'interopérabilité entre les systèmes d'information : les informations du « minimum dataset » de CRB-Anim correspondant aux grandes catégories « qui, quoi, quand, où, comment, pourquoi » permettent de décrire des jeux de données, voire des collections, dans le PNDB. Ces métadonnées sont basées sur le standard international Ecological Metadata Language (EML) développé par le réseau international pour la recherche en environnement et écologie Knowledge Network for Biocomplexity (KNB).

À l'issue de ces consultations, et en conformité avec ces pré-requis, le « minimum dataset » comprend 90 champs descripteurs dont 37 obligatoires. Les champs couvrent 1/ la description de l'animal (qui peut être un embryon) et les données associées ; 2/ la description de l'échantillon et les conditions d'accès et d'utilisation ; 3/ les informations réglementaires sur le déposant ; 4/ la description du CRB et du contact.

Autre étape de l'harmonisation des informations, pour chaque champ descripteur, les valeurs possibles ont été rattachées à des référentiels et des standards nationaux ou internationaux lorsque cela était possible (identifiants na-

tionaux des animaux, taxonomie NCBI, Animal Trait Ontology (ATOL), ontologies des parties de l'organisme (UBERON, BRENDA), NCBI EFO, MIABIS, INRA...). D'autres valeurs ont fait l'objet d'un effort d'homogénéisation dans certains groupes espèces, notamment pour la description des races ou des lignées.

Le « minimum dataset » a été présenté dans sa forme préliminaire lors du séminaire scientifique international du 09/02/2015 et validé par le Conseil de Gouvernance du 14/06/2015.

Spécificités fonctionnelles et choix du prestataire : années 2015-2016

Un livrable du projet a rassemblé la liste des fonctionnalités attendues pour le portail web qui sont résumées ci-dessous :

- Gestion centralisée des échantillons biologiques des différents CRB
 - fournir l'information sur la nature et la disponibilité des collections ;
 - inclure la possibilité de liens vers des publications ou d'autres bases de données ;

Tableau 1 : Catégories de descripteurs et nombre de descripteurs obligatoires constituant le « minimum dataset »

CATÉGORIE	SOUS-CATÉGORIE	NOMBRE DE DESCRIPTEURS	NOMBRE DE DESCRIPTEURS OBLIGATOIRES
Animal	Identification et généalogie	8	5
	Espèce, race et lignée	12	3
	Statut sanitaire	2	1
	Type(s) de maladie(s) connue(s)	4	0
	Phénotype	6	0
	Environnement	7	0
	Pays d'origine de l'animal prélevé (APA)	1	1
	Informations complémentaires	3	0
Échantillon	Identification	3	1
	Motif et date d'entrée en collection	2	2
	Date de prélèvement (APA)	1	1
	Partie de l'organisme, nature (APA)	6	2
	Préparation, Conditionnement	10	4
	Contrôle qualité appliqué	1	1
	Protocole d'utilisation	1	0
	Informations complémentaires, notamment sur le projet de recherche associé	5	1
Déposant	Conditions d'accès (APA)	1	1
	Identification informations administratives, délégataire MTA (non publié sur le portail)	8	7
CRB	Identification, délégataire MTA (non publié)	8	7

- Point d'entrée unique des demandes
 - permettre à un utilisateur de faire une demande d'information, une demande d'entrée ou une demande de sortie d'échantillon(s) ;
 - permettre aux CRBs de traiter les demandes les concernant, et d'interagir directement avec le demandeur ;
 - lier les étapes d'entrée ou de sortie des échantillons à la signature d'un accord de transfert de matériel, (MAA pour l'entrée en collection, MTA pour la sortie de collection) ;
 - enregistrer les étapes d'expédition et de réception ;
 - recueillir l'évaluation du portail par l'utilisateur après chaque transaction terminée ;
- Gestion du portail
 - gérer les comptes utilisateurs ;
 - gérer les tables de référence pour la description des collections ;
 - permettre l'élaboration d'indicateurs d'activité de l'infrastructure.

Un point important a été de définir le niveau d'information accessible à tout public alors que l'intégralité des informations présentes n'est accessible qu'aux utilisateurs authentifiés. Cette distinction devait être bien visible sur le portail, afin d'inciter les utilisateurs à s'authentifier. L'objectif est double : permettre aux CRBs de connaître leur public et rassurer les fournisseurs d'échantillons sur la diffusion des informations associées à leurs échantillons.

Lors des différents ateliers mis en place pour réaliser cette tâche, plusieurs difficultés ont émergé : difficulté à réunir l'ensemble des parties prenantes concernées par les ateliers ; à faire émerger une solution consensus satisfaisant tous les intervenants ; à trouver et à mobiliser certains experts ; à mobiliser les parties prenantes sur la lecture et la validation des spécifications proposées.

Malgré ces difficultés, l'implication des WP leaders et de la coordinatrice du projet dans l'animation continue de cette tâche a permis d'arriver à la définition d'un périmètre fonctionnel exhaustif et très détaillé, comprenant la modélisation des différents processus métiers. Le résultat de ce travail et ces spécifications fonctionnelles ont ensuite pu être validées par le conseil de gouvernance.

En plus des spécifications fonctionnelles, les spécifications non fonctionnelles et techniques (modèle de données, prototypes d'interfaces, etc.) ont également été effectuées par l'informaticien INRA.

L'organisation, la validation et la mise en forme de toutes ces informations au sein d'un cahier des charges ont été ré-

alisées en collaboration avec une cheffe de projet informatique à l'IDELE. L'implication d'un consultant expert, externe au projet, a permis de vérifier la lisibilité et la cohérence du cahier des charges et, également, de s'assurer que celui-ci respectait les règles de l'art du domaine – essentiel dans le cadre d'un marché public.

Le cahier des charges produit (43 pages pour le document principal + 47 pages d'annexes) était très exhaustif et détaillé, aussi bien sur les aspects fonctionnels que techniques ; il répondait à tous les points d'interrogation qui auraient pu nécessiter une réflexion longue et concertée du WP4, et a ainsi permis aux prestataires de pouvoir soumettre des offres au plus proche de la réalité du besoin.

L'appel d'offres a été effectué dans le cadre d'un marché public à procédure adaptée. Un dossier « BOAMP » a été rédigé en collaboration avec les services marchés et juridiques du centre INRA de Jouy-en-Josas. Ce dossier contenait le Cahier des Clauses Techniques Particulières (CCTP) dérivé du cahier des charges de départ, le Cahier des Clauses Administratives Particulières (CCAP), le Règlement de Consultation (RC) ainsi que l'acte d'engagement (AE). Une condition non négociable était que le code source soit ouvert et fourni à l'INRA à la fin de la prestation.

Ce dossier a été déposé sur le portail des marchés publiques le 15/01/2016, pour une durée de 6 semaines. Au final, 8 offres ont été déposées et des entretiens de négociation menés avec 4 soumissionnaires les 25 et 29 mars 2016. Le choix du prestataire a été réalisé en avril, et la prestation a débuté en mai 2016. L'offre de la société Key Consulting a été retenue. Elle incluait un module de formation de 21 jours de l'ingénieur informaticien INRA, point novateur et essentiel permettant d'évaluer la qualité du code du prestataire, de suivre au plus près l'adéquation entre besoins – cahier des charges – réalisation et de garder la main sur l'évolution ultérieure du portail.

Développement du portail : 2016-2017

Le portail CRB-Anim a été développé sur la période 2016-2017 dans le cadre d'une prestation de service couvrant deux volets : 1/ le développement technique des fonctionnalités requises inscrites dans le cahier des charges et 2/ la formation, de 21 jours, de l'ingénieur informaticien INRA (développeur, co-leader du WP4) aux principales technologies utilisées. Les principaux outils utilisés pour le développement du portail et la gestion des interactions avec les utilisateurs ont été AngularJS et Java, alors que la base de données a été développée avec MariaDB, un système de gestion de base de données en code ouvert.

Le développement a suivi un mode de programmation agile, avec des points réguliers où l'ingénieur informaticien INRA et la coordinatrice de CRB-Anim devaient examiner et valider, ou réorienter, les développements faits par le prestataire. Chaque « sprint » durait 3 semaines (Figure 1). Ce rythme exigeait une grande vigilance de leur part, tout écart au cahier des charges initial pouvant donner lieu à une « évolution », facturée en sus par le prestataire. Cinq itérations étaient prévues pour la réalisation du volet 1, la sixième itération étant consacrée au volet 2. Toutefois, l'ingénieur informaticien INRA a commencé à être associé aux développements pendant le volet 1.

Différentes phases de test ont été menées avec les utilisateurs de l'application, tant au niveau recherche d'échantillons qu'à celui de la gestion des demandes par les CRBs et les groupes espèces lors de la « vérification d'aptitude au bon fonctionnement » (VABF), afin de s'assurer que la version livrée était conforme aux spécifications validées dans le cahier des charges.

Ces phases de test se sont avérées essentielles pour :

- 1/ Pointer les anomalies bloquantes, majeures et mineures.
- 2/ Identifier les fonctionnalités et améliorations à apporter au portail.
- 3/ Engager les partenaires de CRB-Anim et les parties prenantes du portail dans une démarche d'appropriation de l'application.

Les évolutions à apporter à l'application dans le cadre de la prestation ont été validées lors du Conseil de gouvernance du 29 novembre 2016. Le portail CRB-Anim a ensuite été présenté au Conseil de gouvernance de CRB-Anim le 10 février 2017 avec ses fonctionnalités :

- Fonctionnalités essentielles qui permettent, d'une part, de fournir des informations sur la nature et la disponibilité des échantillons biologiques gérés par les CRBs de CRB-Anim et, d'autre part, de fournir un point d'entrée unique - ainsi qu'un système de suivi - pour des demandes de renseignement sur des groupes ou des échantillons particuliers.
- Fonctionnalités spécifiques de gestion avancée des demandes de sortie et d'entrée des échantillons. Celles-ci sont ainsi gérées dans l'application : cela permet un suivi fin de l'utilisation des ressources de l'infrastructure.

À titre d'exemple, la figure 1 montre l'interface de recherche avancée. Dans le cas des utilisateurs non-authentifiés, cette interface ne donne accès qu'à un sous-ensemble des informations sur les échantillons, et les noms des CRB sont anonymisés.

La formation de l'ingénieur informaticien INRA sur les méthodes et technologies utilisées par le prestataire de service a permis : 1/ l'appropriation du code source ouvert de l'application développée et 2/ le développement de fonctionnalités hors du périmètre initialement prévu au cahier des charges mais ayant émergé des retours des utilisateurs lors des phases de test.

L'application a ainsi bénéficié d'améliorations majeures :

- Internationalisation des interfaces (anglais/français) accompagnée de l'internationalisation des données lorsque cela était possible (ontologies anglophones et référentiels francophones). Ces améliorations concourent à la visibilité et à la valorisation internationale des produits et services de CRB-Anim.
- Assignation d'un groupe espèce (experts) aux demandes d'entrée et implémentation de l'envoi de notifications lors d'actions réalisées dans l'application (évaluation d'un CRB ou du groupe espèce assigné, nouvelle demande de renseignement, etc.). Ces notifications sont essentielles pour tenir les utilisateurs du portail informés du suivi et du déroulé des étapes de leurs demandes.
- Ajout des aides contextuelles sur les interfaces simple et avancée de recherche (champ avec exemple, information sur l'origine des termes suggérés par l'auto-complétion, etc.). Ces informations orientent clairement le portail CRB-Anim vers les utilisateurs externes.

Le mode de développement mis en place, associant étroitement prestataire et ressources internes a rendu l'infrastructure CRB-Anim autonome pour la maintenance évolutive et corrective et a fourni une base pour la pérennité du système d'information.

L'ensemble des objectifs prévus ont été atteints dans les délais convenus. La version finale de l'application a été livrée en janvier 2017, suivie de la phase de « vérification d'aptitude au bon fonctionnement » (VABF). Cette période de 2 mois visait à vérifier que l'application livrée répondait bien aux spécifications établies. Lors de cette phase de VABF, des essais intensifs ont été réalisés pour tester de manière exhaustive l'ensemble des fonctionnalités de l'application - et ce sur chacune des 7 versions finalement livrées durant cette phase. Chacune des versions intégrait les correctifs relatifs aux anomalies constatées sur la version précédente.

Recherche avancée

Population

#1 Espèce

Equus caballus - Cheval / Horse Ajouter une valeur

Ne doit pas contenir les valeurs choisies Toutes les valeurs

#2 Race

franc Ajouter une valeur

Ne doit pas contenir les valeurs choisies Toutes les valeurs

#3 Lignée

Ajouter une valeur

Ne doit pas contenir les valeurs choisies Toutes les valeurs

Type de lignée

Type de production

Motif entrée en collection

Animal

Sexe

Femelle Hermaphrodite Inconnu

Mâle

Toutes les valeurs

Année de naissance

À partir de jusqu'à

Toutes les valeurs

Maladie

Ajouter une valeur

Ne doit pas contenir les valeurs choisies Toutes les valeurs

Information phénotypique associée

Ajouter une valeur

Ne doit pas contenir les valeurs choisies Toutes les valeurs

Échantillon

Nature de l'échantillon

Ajouter une valeur

Ne doit pas contenir les valeurs choisies Toutes les valeurs

Partie de l'organisme

Ajouter une valeur

Ne doit pas contenir les valeurs choisies Toutes les valeurs

Réinitialiser
Rechercher

74 animaux ont des échantillons correspondant à vos critères de recherche.

<input type="checkbox"/>	Nb. animaux	Nature de l'échantillon	Espèce	Race	CRB
<input type="checkbox"/>	2	semén	Equus caballus	Selle Français	Centre de Ressources Biologiques de VetAgro Sup
<input checked="" type="checkbox"/>	10	DNA	Equus caballus	Selle Français	CRB @BRIDGE
<input checked="" type="checkbox"/>	2	semén	Equus caballus	Poney Français de Selle	Cryobanque Nationale
<input type="checkbox"/>	60	semén	Equus caballus	Selle Français	Cryobanque Nationale

Télécharger la sélection
Télécharger tout
Renseignements
Ajouter au cryopancier

Réinitialiser
Afficher les échantillons

Figure 1. Interface du portail pour la recherche avancée sur les collections

Alimentation du portail et vérification de service régulier : 2017-2018

Après la validation de la VABF, en mars 2017, la dernière phase de validation de l'application appelée « vérification de service régulier » (VSR) a débuté pour une durée de 3 mois. L'objectif de cette phase de test était de vérifier le bon fonctionnement de l'application en conditions d'utilisation réelle. Cette étape ne pouvait être pleinement réalisée qu'avec l'alimentation de la base de données du portail avec les données des CRBs, cela afin d'évaluer les performances du portail avec un volume de données significatif, proche de celui attendu *in fine*.

La stratégie définie pour le transfert de données depuis les systèmes d'information des CRBs vers le portail a été celle

de l'ETL (extract - transform - load) permettant d'extraire des données de ces systèmes d'information, de les re-structurer au format souhaité, puis de les charger sur le portail CRB-Anim. La définition des ETL, pivot pour l'alimentation du portail, a alors débuté sous la conduite d'un assistant ingénieur recruté spécifiquement. Sa mission principale était de concevoir et d'implémenter les composants ETL permettant de convertir les fichiers d'export issus des différents systèmes d'information des CRBs vers un format de fichier standardisé, celui du portail, afin d'alimenter la base de données du portail CRB-Anim. Cette action s'est déroulée pendant toute l'année 2017. Les informaticiens de l'infrastructure CRB-Anim (ingénieur informaticien et assistant ingénieur) se sont déplacés dans chaque CRB pour présenter les pré-requis du portail, réaliser un état des lieux

des données présentes dans les systèmes d'information locaux, développer un prototype d'import, tester l'import, analyser le taux de rejet, identifier les motifs de rejet, actualiser les vocabulaires ou tables de références pour mettre en conformité les données du CRB avec les pré-requis de la base de données du portail, tester l'import de nouveau et recommencer l'analyse des rejets autant que nécessaire pour atteindre l'étape finale où toutes les données étaient intégrables dans le portail. Ce processus de «hackathon» a pris 2 à 3 jours par CRB pour finaliser le premier import de leurs données. Au-delà de l'import des échantillons des différents CRBs dans le portail central, ce travail d'« audit des données » a également permis d'identifier des pistes d'amélioration et d'harmonisation pour optimiser le niveau d'interopérabilité des données locales.

Le portail a été officiellement lancé lors du séminaire international de l'infrastructure CRB-Anim qui s'est tenu les 11 et 12 mai 2017 à Paris, en présence du comité scientifique international. Ce lancement a permis de mobiliser les CRBs et certains utilisateurs « test » pour évaluer l'application dans des conditions réelles. L'assistant ingénieur a également pris en charge l'ensemble des tests réalisés dans le cadre de la recette technique. Pour la recette fonctionnelle, il a été appuyé ponctuellement par l'ensemble des partenaires du projet, répartis en groupes d'utilisateurs ayant des rôles particuliers dans l'application, ceci afin de pouvoir simuler l'ensemble des cas d'utilisation potentiels. La réalisation des tests fonctionnels exhaustifs sur l'ensemble des fonctionnalités de l'application et leur qualification a demandé un effort important aux informaticiens de l'infrastructure, allant jusqu'à la négociation avec le prestataire pour la prise en charge des améliorations de l'application sans surcoût. L'harmonisation des vocabulaires de référence a aussi posé quelques difficultés pour obtenir un consensus entre plusieurs CRBs.

Lors de cette phase de VSR, deux nouvelles versions de l'application ont été livrées et déployées en production. À la suite de la validation de la VSR, la phase de garantie d'un an a débuté en juin 2017. Cette phase a permis la prise en charge de la correction d'anomalies majeures qui n'avaient pas été relevées lors des phases de validation précédente.

Le portail <https://crb-anim.fr/access-to-collection> a été ouvert à tout utilisateur le 15 septembre 2017.

Amélioration continue du portail : 2018

L'accompagnement du déploiement du portail a suscité plusieurs actions vers ses différents utilisateurs :

- Favoriser l'appropriation du « minimum dataset » par les déposants d'échantillons biologiques.
- Favoriser l'appropriation de l'application par les CRBs et les groupes espèces à travers une formation.
- Faire connaître le portail lors de congrès scientifiques, avec notamment une présentation au Congrès Européen de Productions Animales en 2018.

L'administrateur du portail a mis en place une « forge de développement » pour décrire, classer et traiter toutes les remontées d'utilisateurs, en considérant leur caractère plus ou moins bloquant afin de prioriser leur traitement. Plus de 70 améliorations ont été traitées depuis l'ouverture du portail, dont 11 étaient critiques et 21 classées importantes. Il y a également eu 5 incidents de production dont la résolution était hautement prioritaire. Améliorer la documentation et l'aide en ligne est un effort continu, au fur et à mesure que de nouveaux utilisateurs signalent de nouveaux besoins.

Actuellement plus de 135 000 échantillons provenant de 14 espèces d'animaux domestiques sont accessibles via le portail pour 5 CRBs.

La réglementation sur l'accès aux données personnelles est entrée en vigueur après l'ouverture du portail. Des données à caractère personnel sont enregistrées pour la gestion des ressources, l'accès aux ressources et le suivi des utilisateurs. CRB-Anim étant une infrastructure de recherche et la recherche étant une mission d'intérêt public, la base juridique du traitement des données personnelles sur le portail est l'exécution d'une mission d'intérêt public dont est investi chaque centre de ressources biologiques, et donc l'infrastructure CRB-Anim. La politique des données de CRB-Anim est ainsi en cours de validation et sera prochainement affichée sur le portail.

Conclusion

Le développement du portail a joué un rôle fédérateur pour les CRBs de l'infrastructure CRB-Anim. L'objectif d'un guichet unique a été atteint. Sa convivialité peut encore être améliorée, de même que certains vocabulaires anglais, mais les fonctionnalités souhaitées sont opérationnelles. La phase de maintenance corrective et évolutive ne connaît pas de terme annoncé. Toutefois, le maintien de la compétence au sein de l'équipe INRAE reste un enjeu, car il est nécessaire de stabiliser cette compétence au sein d'une équipe d'informaticiens.

Le portail répond aux exigences « findable » et « accessible » d'une politique FAIR de données. La principale amélioration à apporter concerne l'interopérabilité avec d'autres

bases de données comportant des données phénotypiques ou moléculaires sur les collections présentes en CRB.

L'existence du portail a facilité le transfert des données des CRB animaux vers le portail web de l'infrastructure RARE, puisque les descripteurs étaient déjà standardisés et les données rassemblées. Il a aussi facilité la contribution des CRBs français au portail européen de données sur les ressources génétiques d'animaux d'élevage (<https://www.image2020genebank.eu/>) développé par le projet H2020 IMAGE avec l'European Bioinformatics Institute (EBI). Le modèle d'intégration des données a constitué un exemple pilote pour le développement du portail IMAGE qui a aussi

développé un outil automatique d'intégration de données externes, dénommé « inject tool » (la documentation sur les outils développés par IMAGE est accessible sur <https://github.com/cnr-ibba>). Verser les données de CRB-Anim sur le portail IMAGE répond à l'exigence d'interopérabilité avec les bases de données moléculaires ENA et EVA maintenues par l'EBI. En revanche, il reste à développer l'interopérabilité avec les bases de données des élevages expérimentaux d'INRAE pour ce qui concerne les données phénotypiques. Le livrable d'interopérabilité avec le portail du PNDB reste également à réaliser. ■

Remerciements

Les auteurs remercient les membres du conseil de gouvernance et les membres des groupes espèces pour leur contribution. L'appui méthodologique de Béatrice Balvay (IDELE) et Cédric Chavériat (ex-FRB) a été précieux pour la préparation du cahier des charges précisant les spécifications fonctionnelles du portail.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Déploiement de Systèmes de Management de la Qualité dans Les Centres de Ressources Biologiques de l'Infrastructure de Recherche RARe

Mélanie MARTIGNON¹

Valérie BERGHEAUD²

Samuel BUFF³

Victoria CHUAT⁴

Roland COTTIN⁵

Juliette GOUSSOPOULOS⁶

Déborah JARDET⁷

Michèle TIXIER-BOICHARD⁷

Florence VALENCE⁴

CORRESPONDANCE

melanie.martignon@inrae.fr

RÉSUMÉ

Le système de management de la qualité d'une structure est un outil d'appui au pilotage. Cet article présente plusieurs systèmes déployés, ou en cours d'élaboration, dans les centres de ressources biologiques de l'Infrastructure de Recherche RARe. Ils constituent un panel des situations existantes dans chacun des cinq piliers (animal, environnement, forêt, microorganisme et plante), et présentent la diversité existante en termes de maturité, de normes de certification, de contextes spécifiques. Pour chacun des cas présentés, nous analysons les bénéfices perçus et les difficultés traversées.

La reconnaissance externe du niveau d'organisation qu'apporte la certification est un attendu de l'infrastructure de recherche. C'est pourquoi elle propose aux centres de ressources biologiques des animations pour favoriser le partage d'expériences et la montée en compétences des collectifs.

MOTS-CLÉS

Système de management de la qualité, centre de ressources biologiques, RARe, diversité biologique, infrastructure de recherche, normes, ISO 9001.

1 INRAE, UE GBFor, 45075, Orléans, France.

2 Université Paris-Saclay, INRAE, Département de Biologie et Amélioration des Plantes, 78026, Versailles, France. Université Paris-Saclay, INRAE, Infrastructure Nationale de Ressources Agronomiques pour la Recherche (RARe), Centre de Ressources Biologiques pour les Plantes de l'Infrastructure RARe (BRC4Plants), 78026, Versailles, France.

3 Université de Lyon, VetAgro Sup, UPSP ICE & CRB CryAnim, 69280 Marcy l'Étoile, France.

4 UMR1253 STLO, CIRM-BIA, INRAE, Institut Agro, F35000, Rennes, France.

5 CIRAD, UMR AGAP Institut, F-34398, Montpellier, France.

UMR AGAP Institut, Univ. Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France.

6 UR GAFL, INRAE, 84140 Montfavet, France.

7 Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350 Jouy-en-Josas, France.

Deployment of quality management systems in the biological resource centres of the AgroBRC infrastructure

Mélanie MARTIGNON¹

Valérie BERGHEAUD²

Samuel BUFF³

Victoria CHUAT⁴

Roland COTTIN⁵

Juliette GOUSSOPOULOS⁶

Déborah JARDET⁷

Michèle TIXIER-BOICHARD⁷

Florence VALENCE⁴

CORRESPONDENCE

melanie.martignon@inrae.fr

ABSTRACT

The quality management system of a structure is a management support tool. This article presents several of the systems deployed or in the process of formulation in the biological resource centres of the AgroBRC/RARe research infrastructure. They form a panel of situations present in each of the five pillars (animal, environment, forest, microorganisms and plants), and represent the diversity that exists in terms of maturity, certification standards, and specific contexts. For each of the cases presented, we analyse the benefits perceived and the difficulties encountered.

The external recognition of the level of organisation provided by certification is an expected goal of the research infrastructure. That is why it organises events for the biological resource centres to foster sharing experiences and improving the skills of the teams involved.

KEYWORDS

Quality management system, biological resource centre, AgroBRC/RARe, biological diversity, research infrastructure, standards, ISO 9001.

¹ INRAE, UE GBFor, 45075, Orléans, France.

² Université Paris-Saclay, INRAE, Département de Biologie et Amélioration des Plantes, 78026, Versailles, France. Université Paris-Saclay, INRAE, Infrastructure Nationale de Ressources Agronomiques pour la Recherche (RARe), Centre de Ressources Biologiques pour les Plantes de l'Infrastructure RARe (BRC4Plants), 78026, Versailles, France.

³ Université de Lyon, VetAgro Sup, UPSP ICE & CRB CryAnim, 69280 Marcy l'Étoile, France.

⁴ UMR1253 STLO, CIRM-BIA, INRAE, Institut Agro, F35000, Rennes, France.

⁵ CIRAD, UMR AGAP Institut, F-34398, Montpellier, France.

UMR AGAP Institut, Univ. Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France.

⁶ UR GAFL, INRAE, 84140 Montfavet, France.

⁷ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350 Jouy-en-Josas, France.

Introduction

Un système de management de la qualité est un outil d'appui au management, comme son nom l'indique. Il incite à l'analyse du contexte, des risques et des enjeux afin d'établir une stratégie à court, moyen et long terme de la structure. Il appuie le pilotage par le suivi d'indicateurs établis selon les objectifs fixés. Il encourage une organisation transversale, fondée sur l'approche processus, et soutient la mise en œuvre d'une dynamique collective d'amélioration continue, par l'implication du leadership et des acteurs. L'ensemble de ces actions apporte de la confiance et permet une prise de décision fondée sur des preuves à tous les niveaux de l'organisation. Un système de management de la qualité dans un CRB (Centre de Ressources Biologiques) offre ainsi un appui dans la gestion au quotidien, avec une organisation pleinement orientée vers la satisfaction clients et la qualité des ressources diffusées. L'infrastructure de recherche RARE a explicitement inclus, dans sa charte d'adhésion, un critère sur une reconnaissance externe du niveau d'organisation, soit par la labellisation « Centre de Ressources Biologiques » décernée par le GIS IBISA, soit par une certification de la structure selon la norme ISO 9001 ou, jusqu'en 2023, selon la norme métier NF S96-900. L'engagement pris par l'infrastructure auprès du Ministère est que l'ensemble de ses CRB constitutifs seront certifiés dans un proche avenir. Bien sûr, les apports d'une organisation selon un système de management de la qualité sont un atout à chaque niveau de l'infrastructure. Ainsi, les Piliers se structurent aussi selon cette philosophie, sans toutefois chercher systématiquement une certification à ce niveau de l'organisation.

Le CIRM-BIA (Pilier microorganisme), un CRB certifié depuis plus de 10 ans

Le Centre International de Ressources Microbiennes (CIRM) est un Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS), créé en 2004 par l'INRA, qui a pour vocation la préservation, l'enrichissement et la valorisation de la diversité microbienne présente dans ses collections. Il est constitué de cinq entités distinctes en fonction des ressources hébergées, dont le CIRM-BIA. Il compte aujourd'hui plus de 22 000 souches de champignons filamenteux, levures, bactéries alimentaires, pathogènes et bactéries associées aux plantes. Les missions du CIRM consistent à acquérir, authentifier, préserver et diffuser ses ressources microbiennes à la communauté scientifique internationale, académique ou industrielle. Le CIRM fournit également des informations et des services associés aux souches qu'il préserve.

Dès la création du GIS et en accord avec sa convention, afin de répondre aux lignes directrices de l'OCDE relatives aux « pratiques exemplaires concernant les CRB », il a été décidé que chaque CIRM mette en place un système qualité et se fasse certifier dans les plus courts délais selon

le référentiel ISO 9001. Chaque CIRM étant spécifique en termes de ressources hébergées, mais également en termes d'unité INRAE d'accueil (locaux, organisation, modalités de fonctionnement des unités d'accueil), la mise en place des systèmes qualité s'est faite de manière indépendante, avec des systèmes et des périmètres de certification propre à chacun.

Depuis 2017, le GIS CIRM a rejoint l'infrastructure RARE. Il fait partie du pilier Microbien qui comprend le GIS CIRM ainsi que la biobanque SAMBO de Metagenopolis (MGP) également certifiée ISO 9001.

La mise en place de la certification au sein du CIRM-BIA

Le CIRM-BIA, dédié aux bactéries d'intérêt alimentaire, a été créé en 2006 à l'INRAE de Rennes, au sein de l'UMR Science et Technologie du Lait et de l'œuf (UMR STLO). L'ingénieur recruté en 2006 pour déployer la structure du CRB avait comme premières tâches de créer le laboratoire dédié à la collection et de mettre en place le système de management de la qualité pour une certification programmée en 2007. En 2006, tout est à mettre en place : équiper le laboratoire, mobiliser les compétences nécessaires aux activités du CRB au sein d'un système de management de la qualité adapté selon le référentiel ISO 9001. Accompagné de personnels de l'unité STLO (impliqués à hauteur de 20 % de leur temps) et d'un fort soutien de la Directrice d'Unité et de l'équipe d'appui à la Qualité INRAE, le SMQ a pu être mis en place en un an, avec une certification réalisée en décembre 2007. Les différentes étapes ont été les suivantes :

- commencer par comprendre la norme ISO 9001, réfléchir ensemble à comment y répondre et définir les activités à inclure dans le périmètre de certification ;
- réfléchir, pour chacune de ces activités, aux processus « Cœur de métier » et « Supports » qui leur correspondent ;
- voir comment les processus pouvaient s'articuler ensemble (cartographie des processus) et quelles étaient les procédures associées ;
- enfin, définir et construire le système documentaire à mettre en place pour sécuriser et garantir l'efficacité du SMQ.

L'ingénieure responsable du CIRM-BIA, assurant également la fonction de responsable qualité, a suivi, en octobre 2006, une formation AFNOR d'une semaine pour comprendre et déployer un SMQ selon la norme ISO 9001. Le déploiement de ce SMQ a commencé de manière effective en décembre 2006. Une fois le domaine de certification défini, à savoir : « *Acquérir, identifier et conserver des souches d'intérêt alimentaire, les diffuser et réaliser des prestations de services* », les processus correspondant à ces activités ont été définis et les procédures, modes opératoires et instructions associés établis. Avec le soutien de l'informaticien de l'UMR associé à l'équipe

CIRM-BIA, une base de données documentaires a été développée pour la gestion de ce système documentaire ; elle est toujours utilisée aujourd'hui. En décembre 2007, le CIRM-BIA est audité et passe avec succès cette première étape en étant certifié ISO 9001:2004.

Avec le recul, les difficultés :

- La principale difficulté a été de mettre en place un SMQ sur une activité qui n'existait pas encore, car en cours de mise en place. Nous n'avions donc pas de recul sur les pratiques de CRB, malgré une bonne connaissance de l'entretien d'une collection déjà présente au sein de l'UMR STLO.
- La seconde difficulté était liée à un problème de vocabulaire, comme par exemple comprendre et accepter le terme de « client ». En effet, ce terme avait pour certains membres du CIRM-BIA un aspect « péjoratif » et incompatible avec la représentation qu'ils se faisaient du service public. Il a fallu ensuite identifier ces clients pour bien comprendre leurs besoins et leurs attentes.

Avec le recul, les points forts :

- L'implication de personnes motivées et « convaincues » du bien-fondé de la démarche qualité. À savoir que l'ensemble des étapes de mise en place du SMQ s'est toujours fait en concertation avec l'ensemble du personnel CIRM-BIA, afin que le système déployé corresponde bien à leurs besoins propres.
- L'appui de l'équipe Nationale Qualité INRAE avec un accompagnement « resserré », concrétisé par la visite mensuelle de notre référent qualité.
- La mise en place de « mini-audits internes » au sein de l'équipe tout au long de la mise en place du système. Exemple : le responsable du processus « Infrastructure » audite le responsable du processus « Diffusion de ressources biologiques ».
- Une implication forte et effective de la direction de l'UMR.

Le développement du système de management de la qualité

Au fur et à mesure du développement des activités du CIRM-BIA (rapatriement de collections, diffusion de souches, mise en conservation...), les processus et les procédures ont été corrigés, modifiés, supprimés dans un but d'amélioration continue vis-à-vis de nos clients bien sûr, mais aussi de facilitation pour que le système déployé réponde au mieux à nos besoins. Ainsi, plus le système tourne, plus la dynamique s'installe, plus les points positifs de la mise en place d'un management de la qualité sont perçus par toute l'équipe. La norme n'est plus suivie, elle sert au CRB ! D'une revue de processus, d'un retour

client, vont ressortir des idées d'améliorations ou des difficultés qui, discutées en revue de direction ou en réunions d'équipe, vont conditionner les objectifs qualité de l'année suivante.

Avec le recul, les difficultés :

- Le changement de version de norme avec l'appropriation de nouveaux termes, par exemple « Parties Intéressées Pertinentes ».
- Arriver à se ménager un espace de liberté et du temps pour prendre du recul sur les activités et le SMQ.

Avec le recul, les points forts :

- Les « exigences de la norme » comme la revue de processus, la revue de direction, les audits deviennent des moments attendus de discussion sur les activités du CRB pour améliorer le système au bénéfice du client et de nous-mêmes.
- La simplification : quand le système est mis en place et que chacun se l'est approprié, vient l'heure de la simplification du système qui bénéficie à tous.

Pour conclure : un investissement bénéfique !

Certifié depuis 13 ans, le système de management de la qualité est maintenant bien installé au sein du CIRM-BIA et tourne « en routine ». Avec le recul, nous ne regrettons pas le temps et l'énergie qui ont été investis pour le mettre en place et le faire évoluer au regard des bénéfices que cela nous a apportés : gain de temps, efficacité, montée en compétence, traçabilité et, enfin, une image plus professionnelle vis-à-vis de nos partenaires pour l'activité de CRB.

Le Pilier Environnement : une diversité de ressources et de contextes pour des CRB certifiés. Exemple du CRB Colisa

Le Pilier Environnement BRC4Env est un réseau de CRB labellisés par le GIS IBISA et/ou certifiés ISO 9001. Il soutient des recherches qui visent à caractériser les composantes biologiques de l'environnement agricole (sol, eau, air) et leur dynamique. Ainsi, il ambitionne de faciliter l'utilisation des ressources biologiques et génétiques conservées par une large communauté scientifique, s'étendant de la recherche en agronomie aux sciences de la vie et de l'environnement. Actuellement, le Pilier environnement inclut quatre centres de ressources biologiques : le centre de ressources génétiques de sols de la plateforme Genosol, en partenariat avec le conservatoire européen d'échantillons de sol, la collection d'hyménoptères parasitoïdes oophages EP-Coll, la collection d'arthropodes continentaux CoArCol et la collection de ressources ichtyologiques Colisa.

Quelques spécificités du CRB Colisa

Le Centre de ressources biologiques Colisa est issu du regroupement, en 2017, de quatre collections intégrant à elles quatre plusieurs centaines de milliers d'échantillons ichtyologiques (=échantillons de poissons : écailles, otolithes, tissus...). Il est labellisé centre de ressources biologiques par le GIS IBISA depuis 2018. Pilotés par deux organismes de recherche, INRAE et OFB, les quatre sites impliqués sont distants de plusieurs centaines de kilomètres. Ils se trouvent à Rennes, Eu, Thonon-les-Bains et Saint-Pée-sur-Nivelle. Le CRB Colisa s'appuie sur des entités d'adossement qui pilotent les ressources humaines, financières et matérielles. Ainsi, seule une partie des activités de chacun de la quinzaine d'agents du CRB est au profit des missions du CRB, le reste des activités étant au bénéfice de l'unité à laquelle il est administrativement rattaché.

Un SMQ sur mesure

La création du système de management de la qualité a été initiée en février 2019. Et il a été choisi de s'orienter vers une seule certification, pour le CRB Colisa, et non vers une certification individuelle de chacun des sites. En effet, l'objectif était d'avoir une stratégie et un fonctionnement communs entre les sites, ce qui n'aurait pas été possible avec une certification par site. Malgré cela, certaines spécificités, liées aux espèces étudiées et au fonctionnement de chaque site, sont conservées.

Pour faire le lien avec les entités d'adossement, le comité de direction intègre le directeur de chacune d'entre-elles. Il se réunit une fois par an, pour la revue de direction, et arbitre les priorités et les ressources humaines, financières et matérielles. Ce sont ces entités qui pilotent les ressources. Aussi, cette organisation permet-elle, lorsque cela est possible, d'aligner les moyens avec la stratégie du CRB Colisa ou, dans le cas contraire, de prioriser les actions au regard des moyens disponibles.

Des sites en synergie

Avec l'appui du qualitatif de la plateforme d'appui à la certification INRAE, le système de management de la qualité a été construit afin de favoriser les échanges et le partage d'expériences entre les sites. Ainsi, le système comporte peu de processus, quatre en totalité, dont un seul processus cœur de métier qui correspond à la gestion de la collection. Ce processus, qui inscrit les activités de l'introduction jusqu'à la mise à disposition, en passant par la conservation des ressources et la caractérisation des traits d'histoire de vie, réunit tous les acteurs du CRB. Il est donc un moment clé de l'animation du CRB. Par ailleurs, pour chacun des groupes processus, il y a au moins un représentant par site. Cela permet de prendre des décisions concertées, pour lesquelles chaque site peut exprimer son avis, présenter ses pratiques et souligner ses spécificités. Et, dans l'idée d'homogénéiser les pratiques de caractérisation entre les divers sites du CRB, des sessions d'intercalibration des lectures de traits de vie à partir des écailles sont organisées régulièrement.

Des acteurs impliqués

La coordination du CRB tient à favoriser l'implication de l'ensemble des acteurs. Ainsi, plusieurs animations sont mises en œuvre chaque année. Elles concourent à une dynamique collective et, petit à petit, à un esprit collectif, malgré la distance géographique. Les acteurs ont été mobilisés pour construire les processus et élaborer le système. Ils peuvent proposer des améliorations, sont sollicités pour traiter les anomalies et sont régulièrement consultés pour des propositions d'actions à mettre en œuvre ou pour les choix de pratiques à harmoniser, par exemple. Au final, l'un des points forts observé de la démarche a été de renforcer l'esprit collectif malgré la dispersion des acteurs.

Prise de recul sur les apports et les difficultés

Le temps passé en réunions consacrées à l'élaboration collective du système et à favoriser sa prise en main est une difficulté soulignée. En effet, les acteurs, très pris par d'autres activités de terrain ou de management, n'ont pas toujours trouvé un intérêt à la démarche participative mise en œuvre. Toutefois, maintenant que le système est élaboré, des réunions traitant de questions opérationnelles succèdent spontanément aux réunions de construction du système. Celles-ci visent l'amélioration de l'organisation des activités métier et de terrain et devraient apporter un bénéfice au quotidien aux acteurs.

Le système de management de la qualité a été certifié ISO 9001 en juillet 2020. L'implication des acteurs et l'adéquation du système au contexte sont régulièrement mises en avant lors des audits. En interne, la mise en vie du système est soulignée comme un atout. Les acteurs de Colisa attribuent à cette organisation une mise en valeur et une reconnaissance de leur travail par une meilleure visibilité. De plus, la gestion des anomalies et des propositions d'améliorations permet d'avancer sur des points qui étaient connus, mais mis de côté. Maintenant que les activités s'inscrivent dans ce système de management de la qualité, les dysfonctionnements sont tracés et traités collectivement pour poursuivre la progression, ce qui participe à la démarche d'amélioration continue.

Le Pilier Animal : le Programme d'Investissements d'Avenir au service des démarches qualité d'un réseau de CRB

L'organisation du pilier animal a été suscitée par l'appel Infrastructures Nationales en Biologie et Santé du premier Programme d'Investissements d'Avenir ouvert en 2010 (PIA1). Le plan-type des projets à déposer comportait un chapitre sur les activités intégrées entre les CRB participant à la construction de l'infrastructure. À l'époque, la norme AFNOR pour les centres de ressources biologiques, déjà développée pour les CRB humains et microbiens, venait d'être transposée aux CRB animaux et végétaux, constituant la norme NF S96-900. L'objectif du PIA1 CRB-Anim était d'organiser les CRB animaux et

de renforcer les synergies entre eux, au service de la recherche sur les animaux domestiques et la préservation de leur diversité génétique.

Une feuille de route intégrant la certification

Dès le dépôt du projet, la nécessité de professionnaliser le fonctionnement des CRB par le management de la qualité a été mise en avant pour construire la confiance et garantir la qualité du matériel biologique conservé et distribué. L'adoption de la norme NF S96-900 était une opportunité pour établir la feuille de route « qualité » de CRB-Anim. Une cartographie standard des processus d'un CRB figurait donc dans le projet soumis en 2011 et accepté en 2012, avec l'identification du processus pilotage, des processus métiers et des processus supports. Une qualitiennne a été recrutée, pour un contrat de trois ans, afin de faire un état des lieux des CRB et de les accompagner dans l'établissement de leurs processus et procédures, en tenant compte de leurs spécificités. Des réunions de partage d'expériences ont été organisées dans chaque CRB avec une visite du CRB invitant. La lettre d'engagement de la gouvernance de CRB-Anim a été validée en 2015 et précisait notamment « *La gouvernance du réseau s'engage dans une démarche qualité répondant aux exigences de la norme ISO 9001, et les CRB constituant le réseau s'engagent dans une démarche de management de la qualité selon la norme NF S 96-900* ». Un des livrables du projet correspond à la certification NF S 96-900 des CRB.

À ce jour, l'objectif n'est pas totalement atteint : si deux CRB sont déjà certifiés, les trois autres ont lancé la démarche mais n'ont pas encore atteint la certification. Il est certain que le départ de la qualitiennne a ralenti le processus, mais la démarche doit être appropriée par chaque CRB afin d'aboutir. Le projet PIA1 se terminant le 30 juin 2022, le terme du calendrier de certification approche. En 2021, un troisième CRB devrait l'obtenir en décembre après son audit en novembre, et un quatrième a réalisé son audit interne en octobre. La démarche qualité de la gouvernance de CRB-Anim est maintenant intégrée dans le groupe de travail « Management de la Qualité » de RARe. Au sein du pilier, la condition fixée par la gouvernance est la certification de chaque CRB conformément à la norme ISO 9001:2015, puisque la norme NF S96-900 ne sera plus au catalogue AFNOR d'ici trois ans.

Mise en œuvre d'une double certification :

le CRB @BRIDGE

Lors du dépôt du projet CRB-Anim, ce CRB, dénommé GADIE à l'époque, était certifié depuis 2009, pour la norme ISO 9001:2008. Le CRB avait, en effet, une mission centrale en génétique animale avec la conservation et la distribution des banques de BAC, créées par les chercheurs du département et utilisées pour la cartographie des génomes animaux. Ces banques étaient un outil de référence mis à la disposition de la communauté internationale. Les points forts apportés par la certification ISO 9001 étaient d'optimiser le fonctionnement du CRB, de faciliter

sa reconnaissance internationale et la construction de la confiance avec les utilisateurs. En 2011, le CRB a étendu son champ d'activité à la constitution de collections d'échantillons biologiques, en appui aux projets de recherche sur la caractérisation génétique des populations d'animaux d'élevage. La feuille de route mise en place par CRB-Anim a conduit le CRB à s'intéresser à la norme NF S96-900 et à la valeur ajoutée qu'elle représentait pour ses activités de gestion de collections biologiques. L'audit interne, réalisé avec un qualitiennne INRAE sur la conformité à la NF S96-900, a permis de mettre en avant deux points forts dans la dimension métier : la formalisation des critères de conformité des ressources, motivant leur rejet ou leur entrée en collection ; l'exigence de publication du catalogue des ressources conservées et distribuables. De plus, la sécurité des collections devait être explicitement garantie. Il a alors été décidé de combiner une certification métier du CRB, en référence à la NF S96-900, avec une certification organisationnelle, en référence à la norme ISO 9001:2008. Cela n'a pas été trop difficile, car ces deux normes étaient bâties sur la même logique de management. La double certification ISO 9001 et NF S96-900 a été obtenue par le CRB en 2016. En 2018, la certification ISO 9001 a été obtenue pour la version 2015 de ce standard.

Mise en œuvre d'une double certification :

le CRB CryAnim

Le CRB CryAnim résulte de l'évolution de l'activité de banque de semences canines, portée depuis 1995 par le CERREC (plateau technique dédié à la procréation médicalement assistée chez les animaux de compagnie) au sein de VetAgro Sup, et son intégration au projet PIA1 CRB-Anim. Depuis 2009, le CRB accueillait déjà les collections d'embryons de lapins produits pour la Cryobanque Nationale, en s'appuyant sur une démarche qualité visant essentiellement à garantir la sécurisation des ressources et la traçabilité des entrées/sorties des échantillons, et bénéficiait de la labellisation IBiSA. En 2012, le CRB CryAnim a étendu son champ d'activité, en s'appuyant sur le Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (CHUV), pour constituer de nouvelles collections en appui aux projets de recherche, en intégrant les échantillons de sang et de tissus, sains ou pathologiques, issus du parcours thérapeutique des animaux présentés en consultation ; depuis 2015, le CRB accueille également les collections de semences et d'embryons équinés issus de la Station de Monte (agrément DDPP). Le déploiement de ces différentes collections s'est accompagné de la mise en place, en 2016, d'un SMQ répondant aux exigences de la norme NF S96-900, tant pour s'inscrire dans la feuille de route établie par CRB-Anim que pour l'adéquation de ce référentiel aux exigences métier du CRB. Cette étape de formalisation s'est largement appuyée sur la démarche BPL (Bonnes Pratiques de Laboratoires) en lui reprenant la rigueur de la traçabilité et la fréquence des audits internes, la rigueur des manipulations des échantillons, la gestion des dossiers des personnels et l'organisation de la revue de direction.

En 2019, le CRB a étendu sa certification au référentiel ISO 9001:2015 en renforçant son analyse des risques et la gestion des compétences de ses agents ; il aspire désormais à une double certification ISO 9001 et ISO 20387 pour le prochain cycle. Depuis près de 9 ans, deux points forts ont marqué cette démarche d'amélioration continue ; elle a permis à la direction du CRB : 1/ de créer une dynamique fédérative pour l'ensemble de ses personnels, et 2/ d'intégrer à ce projet les principaux services de VetAgro Sup fournisseurs et/ou utilisateurs de ressources, tels que le CERREC, la Station de Monte, le CHUV ou l'équipe de recherche ICE (Interactions Cellules Environnement, UPSP 2021.A104) à laquelle le CRB est adossé ; cela a été possible notamment en inscrivant plus largement les modes opératoires, les audits, les équipements et la gestion des personnels correspondant dans le SMQ global. En s'appuyant sur cette double certification, la direction du CRB CryAnim bénéficie, enfin, d'un outil managérial unique, qui lui permet aujourd'hui d'anticiper et de développer sa stratégie à travers l'analyse régulière et objective des attentes des parties intéressées et du SWOT qui l'accompagne.

Pour conclure, pour chacun de ces deux CRB, la mise en œuvre d'une double certification ISO 9001 et NF S96-900 permet d'allier une valence management et organisation à des considérations de terrain pour structurer la gestion des collections et des risques associés. La version 2015 de la norme ISO 9001:2015 aide à formaliser les objectifs métier, ce qui permet d'envisager avec sérénité la disparition annoncée de la NF S96-900.

Le Pilier Plante : un intérêt pour les démarches qualité pour ce pilier et pour ses CRB constituants

Les CRB du pilier plantes gèrent une multitude de collections de plantes d'intérêt agronomique (pommiers, vignes, tomates, pomme des terres, maïs, blé, gazons...), dans des installations variées (pleins champs, vergers, serres...), sous différents climats sur le territoire français métropolitain et d'outre-mer, sous plusieurs tutelles (INRAE, CIRAD, IRD, Écoles d'agronomie, Université...). Pour que cette diversité soit une réelle force de proposition de services pour un grand nombre d'équipes de recherche françaises ou internationales, il est important que l'organisation soit solide et coordonnée aux différentes échelles - au niveau du pilier et de chaque CRB - en référence à une norme internationale. Ainsi, la mise en place d'un système Qualité présente beaucoup d'intérêt.

Le CRB Légumes : la méthode EureQUA, un outil de prise de décision pour aller à la certification

Des collections constituées depuis 1957

Le Centre de Ressources Biologiques Légumes (CRB-Lég)

est basé au sein de l'unité Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (GAFL) du Centre INRAE Provence-Alpes-Côte d'Azur. Cinq collections : aubergine, laitue, melon, piment et tomate d'espèces cultivées et leurs apparentés sauvages y sont conservés, comprenant plus de 10 000 accessions sous forme de graines.

Une gestion impliquant de nombreux acteurs

La longévité des graines étant limitée dans le temps, une partie importante des missions du CRB-Lég est de multiplier les accessions afin de régénérer les stocks. Ces multiplications sont effectuées par les référents espèces du CRB-Lég, appuyés par un personnel temporaire, ainsi que par les membres de l'Unité Expérimentale Avignon Horticulture Méditerranée (AHM) pour la partie gestion des serres. Une partie des collections est également multipliée par les partenaires des réseaux respectifs de chaque espèce.

Ces ressources génétiques sont accessibles aux chercheurs de l'unité ainsi qu'à la communauté scientifique nationale et internationale. Elles sont utilisées, par exemple, pour un projet de génotypage et phénotypage au niveau mondial pour la recherche de gènes de résistances, ainsi que pour un projet d'étude de spéciation afin de comprendre les barrières reproductives. Une partie des collections faisant partie de la collection nationale est également à disposition du grand public.

Le nombre important d'acteurs et d'utilisateurs des collections du CRB-Lég implique une bonne organisation et un suivi à chaque étape des différentes activités. C'est, dans un premier temps, pour s'orienter dans son organisation interne que le CRB-Lég s'est lancé dans la démarche Qualité, afin d'apporter un support organisationnel pour chaque activité et d'améliorer la traçabilité.

Être certifié, pourquoi et comment ?

Afin de s'inscrire dans les stratégies de l'Institut INRAE, de l'infrastructure de recherche RARe et du Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) IBIISA, et dans un objectif d'amélioration de la reconnaissance externe de ses missions au niveau international, le CRB-Lég a étudié la faisabilité de s'engager dans une démarche de certification ISO 9001.

1^{re} étape : analyse du contexte par la méthode EureQUA^{©1}

Le CRB Lég a pris contact avec le Pôle Aide au pilotage par le Management Qualité INRAE qui a proposé comme première étape de participer à la formation interne « Les fondamentaux de la Qualité ». Lors de cette formation, suivie par la Référente Qualité et la Directrice de l'unité GAFL, la méthode d'aide à la décision EureQUA[©] leur a été proposée afin d'évaluer l'organisation des activités au sein du CRB-Lég.

Cette méthode est basée sur une analyse des risques et des opportunités permettant d'établir un plan d'action. Au

1 EureQua[®] est un outil d'identification des facteurs de succès sur tout type d'activités de recherche et d'expérimentation. Il s'agit d'un procédé méthodique qui permet de mettre en place un plan d'action sur les risques et opportunités prioritaires pour les activités de recherche et d'expérimentations.

fil des questionnements énoncés par la garante de la méthode, les réponses des participants ont mis en avant les forces et faiblesses du CRB-Lég. Cela a permis d'identifier les risques et les opportunités de l'organisation des activités afin d'établir un plan d'action. La pertinence de la méthode EureQUA® est de proposer un cheminement clair et simple, où chacun a pu s'exprimer de manière libre.

Témoignage

Chaque participant a exprimé ses idées, ses visions et son vécu du travail au ou avec le CRB-Lég et écouté les avis de chacun. Nous avons pu constater que nos activités, bien que similaires, n'étaient pas menées de la même façon et nous avons pu discuter de l'opportunité d'utiliser telle ou telle pratique.

Nous avons également pu réfléchir sur les moyens de valorisation de nos ressources et notre travail. Chaque décision a été prise collectivement. C'est la présence et la participation active de tous les acteurs lors de cette animation qui l'ont rendue très enrichissante.

2^e étape : prise de décision

La seconde étape vers la certification a été une réunion de sensibilisation à la norme ISO 9001, animée par le Qualiticien Territorial. L'objectif de cette réunion a été de présenter la norme et les avantages d'être certifié pour le CRB-Lég. Il a également été mis en avant l'intérêt de cette procédure pour l'amélioration continue des activités et la traçabilité. C'est suite à cette réunion que tous les acteurs du CRB-Lég ont décidé de s'engager dans la démarche de certification.

3^e étape : mise en actions

La troisième étape vers la certification a été de prendre contact avec le responsable de la Plateforme d'appui à la certification INRAE, afin de programmer un accompagnement approprié. Il a été décidé qu'une formation à la certification ISO 9001 serait assurée, à l'automne 2021, auprès de la responsable et la référente qualité du CRB-Lég ainsi qu'auprès de la Correspondante Qualité du Centre PACA. Suite à cette formation, elles seront accompagnées par la Responsable Qualité RARE, afin de réaliser un état des lieux visant à constater les écarts entre l'organisation actuelle et les exigences de la norme ISO 9001. À l'issue de cette étape, un calendrier sera établi afin de suivre le plan d'action pour espérer une certification du CRB-Lég en 2022.

Dans l'ensemble, la démarche du CRB-Lég vers la certification a été accueillie positivement par l'équipe. L'engagement de la Direction dans cette démarche, au niveau de la mise à disposition de temps de travail dédié à la qualité et de l'appui financier a été primordial pour se lancer sereinement dans cette démarche. C'est le travail conjoint de l'ensemble des acteurs gravitant autour de la Qualité qui a permis la mise en place de ce projet, et c'est aujourd'hui

l'implication de toute l'équipe du CRB-Lég qui permettra sa réalisation.

Le Pilier Forêt : en route vers la certification

Le Pilier Forêt est le dernier Pilier à avoir rejoint l'infrastructure de recherche RARE. Il est composé d'un seul centre de ressources biologiques (CRB) qui gère des ressources forestières de résineux et de feuillus, du type graines, pollens, feuilles, aiguilles, culture cellulaire, bois et arbres sur pieds. Il est distribué sur trois sites opérationnels : Orléans, Pierroton et Avignon. Par ailleurs, certains acteurs de la gestion des compétences et des systèmes d'information sont sur Versailles et Nancy. Seule une partie des activités de chaque acteur est au bénéfice des missions du Pilier Forêt, qui s'appuie sur des unités d'adossement.

Mise en marche du Pilier Forêt et de son système

À la création de la structure, en 2016, les coordinateurs du Pilier Forêt ont décidé d'appuyer l'organisation du CRB sur deux grands axes : le système d'information commun existant et le système de management de la qualité à construire. Le travail sur la construction du système en tant que tel a duré environ trois ans, ce qui a démotivé les acteurs qui ne voyaient que l'aspect théorique du système. Ils ne voyaient donc pas de plus-value à cette organisation transversale, très déconnectée de leurs activités de terrain.

Difficultés rencontrées

L'appropriation du système par les acteurs a été compliquée, pour les points évoqués précédemment, mais aussi, parce que l'entité Pilier Forêt n'existait pas avant l'élaboration du système qualité. Il a donc fallu, en parallèle de leurs activités du quotidien, que les personnes comprennent les attendus de cette nouvelle structure transversale, et en même temps, qu'elles s'approprient le cadre de la norme ISO 9001, avec des termes et des concepts spécifiques. Aussi, la mise en œuvre de cette norme, choisie pour structurer l'organisation, a nécessité un accompagnement par un parcours de sensibilisation aux principes de base du management de la qualité et au fonctionnement de ce système.

Rapidement, une autre difficulté est apparue lors de la construction du système : la superposition des démarches qualité des unités d'adossement et de la démarche du Pilier Forêt pour certaines activités communes. La difficulté rencontrée se situe principalement au niveau de la priorisation des actions à mener, car les unités ont d'autres missions, qu'elles ne peuvent pas négliger, par rapport aux activités de conservation de ressources biologiques qu'elles réalisent pour le Pilier Forêt au bénéfice des utilisateurs de ressources génétiques.

Une solution : la mise en réseau

Afin de limiter la difficulté en local et de faciliter l'interface, un réseau qualité interne au Pilier a été créé, qui regroupe les six animateurs qualité des unités d'adosse-

ment et la responsable du système de management de la qualité du Pilier Forêt. Ce réseau vise aussi à favoriser le partage d'expérience métier. Les acteurs de ce réseau assurent aussi le rôle d'ambassadeurs du système de management transversal auprès de leur unité et, de ce fait, sont très impliqués dans les évolutions de fonctionnement qui se mettent en place.

Depuis 2020, les premiers éléments positifs de la mise en œuvre de la démarche ont pu être observés. L'étape théorique de construction du système a été dépassée pour être au plus proche des activités de terrain, ce qui facilite la mobilisation des acteurs. De plus, les critères d'introduction, la gestion des distributions et la fluidité des interactions entre les processus ont été travaillés, ce qui a donné vie à l'entité Pilier Forêt. Ce fonctionnement commun et l'animation en groupes processus, qui réunissent des acteurs de chacun des sites opérationnels, pallient la distance inter-sites. Pour obtenir une gestion cohérente et applicable au quotidien sur chaque site, le choix a été fait d'identifier ce qui doit être harmonisé : favoriser une bonne traçabilité par exemple. Mais l'homogénéisation totale n'est pas recherchée, en effet, des spécificités de fonctionnement et de gestion peuvent être maintenues sans risque pour la qualité du service rendu.

En route pour la certification

La dynamique collective obtenue par l'ensemble de ces réflexions et par la concertation de tous les acteurs dans la construction du système, de la stratégie et des modalités pratiques de gestion des collections a été renforcée par l'audit blanc (premier audit du système). En effet, les acteurs ont eu à cœur de présenter leurs activités et leur fonctionnement. Cet exercice clé dans une démarche d'amélioration continue a permis de mesurer le chemin parcouru, et de motiver le collectif pour mettre en place

les derniers éléments manquants pour aller sereinement vers l'audit de certification.

Conclusion

Comme l'illustrent les systèmes de management de la qualité présentés ici, la mise en place de la norme ISO 9001 dans les Centres de Ressources Biologiques fédère les collectifs vers un objectif commun, et apporte une dynamique lors de cette démarche. Par ailleurs, la structuration d'une entité selon les principes qui régissent la mise en œuvre d'un management de la qualité améliore le quotidien des agents de terrain, par la définition d'une stratégie, la prise en considération des dysfonctionnements, des anomalies et de l'analyse des risques.

La réussite d'une certification d'un système de management de la qualité découle d'un processus méthodique et évolutif présenté en Figure 1. Ce processus se déroule en trois étapes : la prise de décision d'aller à la certification, la construction et la mise en place du système de management de la qualité, enfin, l'audit blanc qui confirme la possibilité d'aller à la certification. Pourtant, la certification d'un système de management de la qualité n'est que le début d'une démarche progressive d'amélioration continue, ponctuée par des audits internes et externes, qui apportent un regard constructif et une prise de recul sur le fonctionnement de la structure.

Pour atteindre l'objectif de l'IR RARe d'avoir la totalité des CRB certifiés, un Groupe transversal s'organise et propose des services mutualisés aux CRB constitutifs. Ces services apportent la montée en compétences des acteurs, l'accompagnement des collectifs vers leur objectif de certification et la mise en place de moments de partage d'expérience, afin que le vécu des uns bénéficie à tous. ■

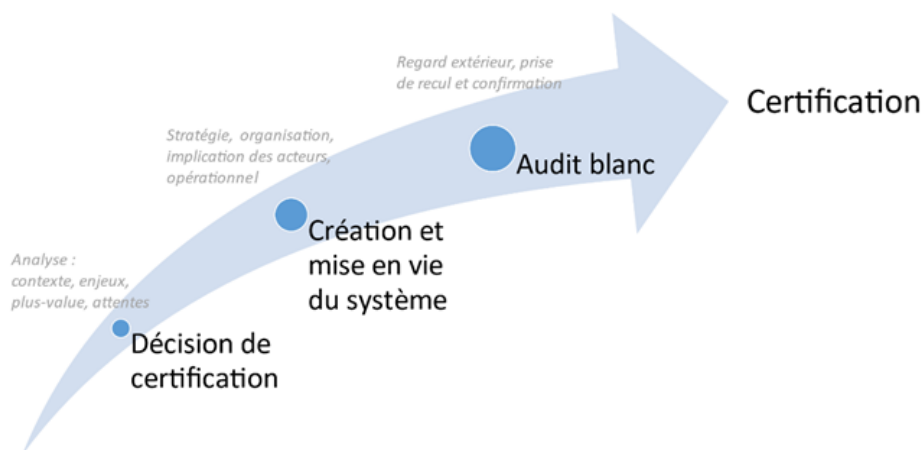


Figure 1. Étapes d'élaboration d'un système de management de la qualité certifié



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL

FOCUS

Bonnes pratiques en valorisation de micro-organismes*

Que faire quand je veux inclure des micro-organismes d'intérêt dans mon projet de recherche ou de valorisation ?

Angèle CHARRIER¹
Florence VALENCE²
Victoria CHUAT²
Stéphanie MERCIER³
Héloïse SIMONSON³
Emmanuelle HELLOIN⁴

CORRESPONDANCE

florence.valence-bertel@inrae.fr

Dans le cadre de la valorisation des ressources microbiennes, le département MICA a souvent été confronté à la gestion de la propriété intellectuelle associée à ces ressources et aux questions réglementaires liées à l'Accès et au Partage des Avantages découlant de leur utilisation (Protocole de Nagoya/APA). Pour répondre à ces problématiques, le département MICA a constitué un groupe de travail coordonné par Angèle Charrier, Chargée de Partenariat et d'Innovation du département et impliquant des membres du réseau CIRM et d'INRAE transfert. L'objectif de ce groupe de travail était de concevoir un outil destiné aux chercheurs utilisateurs de micro-organismes. Il a abouti à la création du mémo « Bonnes pratiques en valorisation de micro-organismes ».

La rédaction de ce mémo s'est appuyée sur les particularités des micro-organismes en général. Les questions relatives à l'origine des ressources (respect du protocole de Nagoya et de l'APA), leur historique d'acquisition et de diffusion (INRAE est-il le détenteur légitime de ces ressources ? La diffusion de ces ressources est-elle maîtrisée ?) et les conditions d'utilisation et de valorisation (qu'ai-je le droit de faire avec ces ressources et sont-elles valorisables ?) restent valables pour tous types de ressources biologiques. Dans ce contexte, une démarche semblable pourrait être envisagée pour des ressources biologiques, autres que microbiennes, soumises aux mêmes contraintes de propriété intellectuelle et réglementaires mais portant d'autres spécificités.

Ce mémo, qui a pris la forme de la plaquette présentée ici, a pour ambition d'aider les chercheurs à respecter la propriété intellectuelle et la réglementation en vigueur, dans le cadre d'un projet de recherche ou de valorisation.

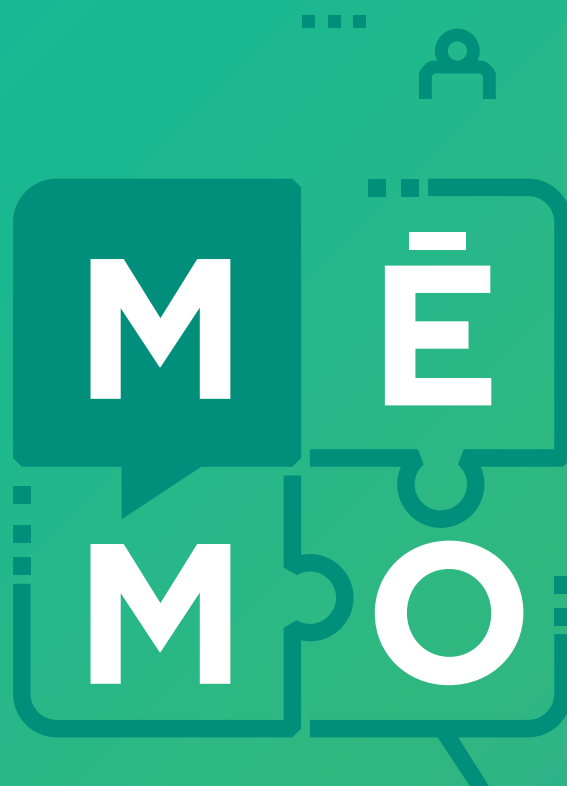
1 INRAE, Département MICA, F- 78352, Jouy en Josas, France.

2 NRAE, STLO, F-35042, Rennes, France.

3 INRAE Transfert, F-75015, Paris, France.

4 INRAE, Université de Tours, ISP, F-37380, Nouzilly, France.

* Document réalisé par le groupe de travail «Valorisation des micro-organismes» du domaine d'innovation micro-organismes source d'innovation pour l'alimentation de l'homme et des animaux.



**+ BONNES PRATIQUES
EN VALORISATION
DE MICRO-ORGANISMES**

*Je veux inclure
des micro-organismes
d'intérêt dans mon projet
de recherche
ou de valorisation*



Avant toute utilisation des micro-organismes

détenus par un laboratoire dans le cadre d'un projet de recherche, d'une collaboration académique ou avec une entreprise, d'un droit d'utilisation ou d'une commercialisation par une entreprise, je dois vérifier s'il existe des conditions, droits ou des restrictions d'utilisation sur ce MO, contractuels ou réglementaires.



EN AMONT DU PROJET

✓ **Je retrace et documente**, autant que faire se peut, l'origine, l'historique et le contexte de l'isolement du micro-organisme (MO) et je consulte l'ensemble des documents juridiques à ma disposition liés à ce MO (MTA, contrats de dépôt, contrats de recherche...) afin d'identifier d'éventuelles conditions ou restrictions d'accès.

✓ **Je vérifie ainsi...**

ORIGINE DU MICRO-ORGANISME	<p>Si je dois accomplir des formalités préalables concernant l'utilisation de ce MO auprès des autorités compétentes au titre de l'APA (Accès aux ressources génétiques et le Partage des Avantages issus de leur utilisation à des fins de recherche).</p> <p><i>Je m'informe sur le site intranet INRAE (https://intranet.inrae.fr/portail-contrats/Bonnes-pratiques/Reglementation-APA2/Qu-est-ce-que-l-APA). Si besoin, je contacte le « National Focal Points » du pays dont est issu le MO en consultant le site (https://absch.cbd.int/countries) pour connaître les démarches à effectuer pour pouvoir l'utiliser.</i></p>
HISTORIQUE	<p>Que l'INRAE est propriétaire ou détenteur légitime du/des micro-organismes.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Propriétaire = si un salarié INRAE a isolé le micro-organisme dans une unité INRAE à partir d'un biotope sauvage, dans le respect de la loi française pour les micro-organismes isolés en France et du protocole de Nagoya pour ceux isolés à l'étranger (cf ci-dessus). • Détenteur légitime = l'INRAE a signé un accord définissant les règles d'utilisation de la souche d'un tiers (ex : contrat de dépôt, Material Transfer Agreement, contrat de collaboration).
CONDITIONS D'UTILISATION ET DE VALORISATION	<p>Que les droits que mon équipe possède ou qui m'ont été concédés sur ce micro-organisme m'autorisent à le mettre en oeuvre dans mon projet ou ne restreignent pas l'utilisation que je peux en faire dans le cadre de mon projet et au-delà (recherche complémentaire, valorisation).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Si je suis le Propriétaire, j'ai maîtrisé la diffusion du micro-organisme via un MTA. • Si je suis le Détenteur, j'ai signé un MTA lors de la réception du micro-organisme qui m'autorise à effectuer des recherches uniquement.

✓ **Je m'assure de la compatibilité** de l'utilisation envisagée avec la déontologie et/ou la réglementation applicable au MO.

- Consentements de patients pour des micro-organismes isolés sur l'homme
- Consentements du producteur (produits artisanaux)
- Formalités particulières d'utilisation et de transfert des souches pathogènes (sécurité biologique)
- Respect des règles de collecte du pays concerné

Un MTA (Material Transfer Agreement), donne un droit d'utilisation à l'unité signataire pour une recherche donnée mais n'autorise généralement pas le transfert à un tiers, voire à d'autres unités de l'INRAE, ni l'utilisation en collaboration avec un partenaire public ou industriel. Pour rappel un MTA est signé par le Directeur d'Unité.

- J'identifie les éventuelles restrictions d'accès et négocie, si besoin, des droits complémentaires auprès du partenaire concerné ou les signale aux partenaires du projet (transfert à des partenaires au sein du projet, recherche complémentaire, valorisation).
- J'indique en annexe du contrat de projet les éventuelles limitations ou conditions d'accès au MO.



DURANT LE PROJET OU EN FIN DE PROJET

Si je souhaite valoriser un ou plusieurs micro-organismes d'intérêt avec mon partenaire industriel :

✓ **Je complète** une Déclaration d'Invention et de Résultats valorisables INRAE (DIRV) et le formulaire valorisation associé pour la traçabilité des souches.

✓ **Je tiens compte des éventuelles restrictions** pour la valorisation identifiées notamment si le MO provient d'un tiers. Pour rappel, les souches « type » ne sont pas valorisables.

✓ **J'effectue les formalités APA** au titre de l'utilisation par l'INRAE, mais les formalités APA pour une utilisation commerciale incombent en revanche au partenaire.

✓ **Je contacte le/la Chargé(e) de Partenariat et Innovation** ou le/la Chargé(e) de valorisation de mon domaine.

> **FORMULAIRES DIRV**

<https://intranet.inrae.fr/partenariat/Media/Fichier/DIRV>

> **CONTACTS CPI**

<https://intranet.inrae.fr/partenariat/Contacts/Charge-e-de-Partenariat-et-d-Innovation-CPI>

> **CONTACTS CV**

<https://www.inra-transfert.fr/fr/espace-chercheur/commercialiser-vos-innovations>

> **SITE INTRANET INRAE**

<https://intranet.inrae.fr/portail-contrats/Bonnes-pratiques/Reglementation-APA2/Qu-est-ce-que-l-APA>

> **SITE NAGOYA ACCÈS ET PARTAGE DES AVANTAGES**

<https://absch.cbd.int/countries>

Ces ANALYSES PRÉALABLES vous permettront de savoir :




> **Si vous pouvez mettre en oeuvre ce micro-organisme** dans le cadre d'un projet de recherche

- Seul (en interne INRAE)
- Avec un partenaire académique
- Avec un partenaire privé

> **Si ce micro-organisme peut faire l'objet d'un accord commercial** avec une entreprise à l'issue du projet.

> **Si ce micro-organisme peut faire l'objet d'un dépôt de brevet**

JE TENTE DE RÉPONDRE AUX QUESTIONS CI-DESSOUS

- Un ensemble de réponses  facilitera la valorisation du micro-organisme
- Si je n'ai pas les réponses  la valorisation peut être compromise
- En cas de réponse  les risques de ne pas pouvoir valoriser sont forts

Pour toutes informations complémentaires, contactez valorisationmicroorganisme@inrae.fr

ORIGINE DU MICRO-ORGANISME

« Est-ce que je respecte la réglementation locale sur l'utilisation des ressources génétiques ? »

- Quel est le biotope d'isolement ?
- Quel est le pays d'origine ?
- À quelle date a-t-il été isolé ?
- Qui a isolé le micro-organisme ?
- Dans quel cadre (projet de recherche avec des partenaires académiques, privés,...) ?

HISTORIQUE

« Est-ce que l'INRAE est le détenteur légitime du micro-organisme ? Ai-je maîtrisé sa diffusion ? »

- Auprès de qui ai-je obtenu le micro-organisme ?
- Existe-t-il dans d'autres collections, d'autres laboratoires ?
- Ai-je diffusé ce micro-organisme à d'autres équipes/partenaires ?
- Quels travaux de recherche sont associés à ce micro-organisme ?

CONDITIONS D'UTILISATION ET DE VALORISATION

« Qu'ai-je le droit de faire avec le micro-organisme, est-il valorisable ? »

- Si un tiers m'a transmis le micro-organisme : ai-je signé un document précisant son cadre d'utilisation (MTA, contrat de dépôt, contrat de recherche, accord de consortium, accord de partage des avantages...)?
- Quelle utilisation/valorisation possible au regard de ce document ?

Je peux utiliser le micro-organisme

✓ Le micro-organisme provient d'un pays (France ou pays étranger) m'ayant donné l'autorisation de l'utiliser à des fins de recherche et/ou de valorisation (APA)

✓ Le micro-organisme provient d'un pays sans réglementation de ses ressources génétiques
Consulter le site : <https://absch.cbd.int/countries>

✓ Le micro-organisme a été isolé par un chercheur INRAE

✓ Dans une unité INRAE

✓ D'un biotope nonensemencé volontairement par des micro-organismes commerciaux

✓ La diffusion du micro-organisme a toujours été encadrée par un MTA, je garde donc le contrôle de la diffusion du micro-organisme

✓ Le micro-organisme a été obtenu par un tiers sous accord qui m'autorise à l'utiliser

✓ Je suis propriétaire du micro-organisme, il n'a jamais été impliqué dans un contrat de recherche ou de licence avec un tiers académique (ma liberté de recherche sur ce micro-organisme est totale)

✓ Je ne suis pas propriétaire, et le MTA que j'ai signé me donne l'autorisation d'utiliser le micro-organisme pour mon projet de recherche

✓ Mon établissement a signé un contrat de dépôt ou un contrat de licence avec le propriétaire me donnant l'autorisation de valoriser ce micro-organisme

Je ne suis pas encore en mesure d'utiliser le micro-organisme

✓ Le micro-organisme provient d'un pays étranger (ayant ou non ratifié le protocole de Nagoya) ou de France et je n'ai pas encore d'autorisation d'utilisation

➢ Je dois obtenir l'autorisation de ce pays pour utiliser le micro-organisme dans mon projet ou pour le valoriser avec une entreprise

✓ Le micro-organisme a été isolé par un chercheur INRAE

✓ Dans une unité INRAE

✓ D'un biotope sauvage, MAIS

✓ La souche est présente dans plusieurs laboratoires INRAE et hors INRAE

➢ Je m'interroge sur les utilisations et diffusions qui ont été réalisées par les autres laboratoires

✓ Je suis propriétaire du micro-organisme, il a déjà fait l'objet d'un contrat de recherche ou de licence.

➢ Je prends connaissance du contrat et me renseigne sur les modalités éventuelles de partage des avantages (définies dans des textes légaux et/ou par un accord de partage des avantages accompagnant le micro-organisme) pour connaître mes droits

Je ne peux pas utiliser le micro-organisme

✓ Le micro-organisme a été isolé d'un pays (ayant ratifié ou non le protocole de Nagoya) ne m'ayant pas autorisé à le valoriser

➢ Je ne peux pas valoriser ce micro-organisme, j'abandonne l'idée de le valoriser

✓ Le micro-organisme a été isolé par l'INRAE d'un produitensemencé volontairement par des micro-organismes commerciaux

➢ Risque d'avoir isolé un micro-organisme commercial appartenant à un industriel

✓ Le micro-organisme n'a pas été isolé par l'INRAE

➢ Un tiers peut en revendiquer la « propriété »

✓ Je manque de traçabilité sur l'origine du micro-organisme

➢ Un tiers peut en revendiquer la « propriété »

✓ Le micro-organisme a été diffusé sans MTA à différents partenaires académiques et/ou industriels

➢ Le contrôle de la diffusion du micro-organisme a été perdu

✓ Je ne suis pas propriétaire

✓ Le MTA que j'ai signé ne m'autorise pas à utiliser le micro-organisme

➢ Je ne peux pas valoriser ce micro-organisme, je tente de revenir vers le propriétaire

✓ Les modalités de partage des avantages sont incompatibles avec l'utilisation que j'envisage



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

La mise en œuvre des réglementations sur l'accès aux ressources génétiques et le partage des avantages (APA) dans les centres de ressources biologiques membres de RARe

Didier BOUCHEL¹

CORRESPONDANCE

didier.bouchel@inrae.fr

RÉSUMÉ

L'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation (APA) font l'objet d'un ensemble de réglementations prises à la suite de la convention sur la diversité biologique (CDB), adoptée en 1992 pour lutter contre le biopiratage au niveau international, et du protocole de Nagoya. L'APA couvre également les connaissances traditionnelles associées (CTA) aux ressources génétiques. Ces réglementations relèvent de la souveraineté des États sur leurs ressources biologiques, et un système d'échange d'informations a été mis en place par le protocole de Nagoya dans un souci de transparence et de traçabilité des accès et des utilisations de ressources génétiques. La France et l'Union européenne, qui sont parties à la CDB et au protocole de Nagoya, ont également adopté des réglementations relatives à l'APA. Les centres de ressources biologiques (CRB) qui détiennent, caractérisent, conservent et distribuent des ressources génétiques sont concernés par l'ensemble de ces réglementations. Le respect des dispositions nécessite que soient disponibles, dans leurs systèmes d'information, un minimum de descripteurs et de données. L'infrastructure de recherche RARe a pour objectifs, en matière d'APA, la conformité des accessions de ses CRB ainsi que l'inscription au registre des collections de l'Union européenne (UE). Pour atteindre ces objectifs, RARe a d'abord élaboré un projet qui a été financé par IBISA : ABS4BRCs, puis a mis en place un groupe de travail transversal dédié à l'APA. Ces actions ont permis de préciser les types de ressources génétiques soumis à l'APA dans les CRB, de former les responsables de CRB et de mettre à leur disposition des outils d'aide à la décision. Une enquête sur les données relatives à l'APA dans les systèmes d'information a permis d'émettre des recommandations pour les adapter aux exigences de l'APA. Il est prévu également, à partir de 2022, d'apporter un appui aux CRB pour leur demande d'inscription au registre des collections de l'UE.

MOTS-CLÉS

Ressources génétiques, RARe, Convention sur la diversité biologique, protocole de Nagoya, accès et partage des avantages, APA, centre de ressources biologiques, CRB, registre des collections UE, système d'information.

¹ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350 Jouy-en-Josas, France.

Implementing regulations on access to genetic resources and benefit-sharing (ABS) in the Biological Resource Centers members of RARe/AgroBRC

Didier BOUCHEL¹

CORRESPONDENCE

didier.bouchel@inrae.fr

ABSTRACT

Access to genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from their utilization (ABS) are subject to a series of regulations issued following the Convention on Biological Diversity (CBD) adopted in 1992 to combat biopiracy at the international level, and the Nagoya protocol. ABS also covers traditional knowledge (TK) associated with genetic resources. These regulations pertain to the sovereignty of States over their biological resources, and an information exchange system was established by the Nagoya protocol in view to ensuring the transparency and traceability of access to, and the utilisation of, genetic resources. France and the European Union, which are Parties to the CBD and the Nagoya protocol, have also adopted regulations relating to ABS. The biological resource centers (BRC) which hold, characterise, conserve and distribute genetic resources are concerned by all these regulations. Compliance with the provisions requires that there are a minimum number of descriptors and data in their information systems. The objectives of the RARe research infrastructure regarding ABS are the compliance of its BRCs' accessions and the inclusion in the European Union's (EU) register of collections. To reach these objectives, RARe first established a project funded by IBiSA: ABS4BRCs, after which it set up a transversal working group dedicated to ABS. These actions permitted specifying the types of genetic resources subject to ABS in the BRCs, training the managers of the BRCs and making decision support tools available to them. A survey of the data relating to ABS in the information systems has made it possible to issue recommendations to adapt them to the requirements of ABS. It is also planned, starting from 2022, to provide support to the BRCs for their application for inclusion in EU's register of collections.

KEYWORDS

Genetic resources, RARe, AgroBRC, Convention on Biological Diversity, Nagoya protocol, access and benefit sharing, ABS, biological resource centre, BRC, EU register of collections, information system.

¹ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350 Jouy-en-Josas, France.

Introduction

Les principes de l'accès aux ressources génétiques et du partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation (APA ou ABS en anglais pour *Access and Benefit-Sharing*) ont été inscrits dans l'article 15 de la convention sur la diversité biologique (CDB) (Nations Unies, 1992) ouverte à la signature au sommet de la Terre de Rio en 1992, entrée en vigueur en 1993. Le protocole de Nagoya sur l'APA relatif à la CDB (Nations Unies, 2010) fixe un cadre de mise en œuvre de l'article 15 en précisant les mécanismes bilatéraux des rapports entre les utilisateurs de ressources génétiques (RG) et les pays fournisseurs. Il instaure également un système de coopération entre États avec un site d'information (*ABS-Clearing House*)² pour assurer la circulation des informations concernant tant le suivi des accès aux RG et accords de partage des avantages que le contrôle de la conformité de l'utilisation par les utilisateurs de chacune des 134 Parties³ du protocole. Celui-ci est entré en vigueur le 12 octobre 2014. Depuis cette date, tout accès à une RG en vue de son utilisation pour la recherche ou la recherche-développement est soumis aux règles définies dans le protocole, dès lors que le pays fournisseur de la RG et le pays où celle-ci fait l'objet d'une utilisation sont Partie au protocole de Nagoya. Ces règles ont pour but de procurer une sécurité juridique, aussi bien pour le pays fournisseur et les populations locales gérant la RG que pour l'utilisateur. Cependant, les contraintes induites par ces démarches ne sont pas sans conséquence sur l'utilisation des RG, notamment pour la conduite des projets de recherche dans les instituts de recherche publique. De plus, on constate que les dispositions prévues par la CDB, le protocole de Nagoya et les différentes réglementations subséquentes sont fréquemment sujettes à des interprétations divergentes entre les différentes parties prenantes (autorités de l'État, populations locales, utilisateurs ...). Or, les RG déposées dans les CRB sont concernées par l'application des règles d'APA des pays d'origine et par l'application du protocole de Nagoya, le cas échéant.

Pour les CRB de RARE, quelles sont les conséquences, favorables ou non, de ces réglementations ? Comment doivent-ils s'adapter, et quels sont les outils mis à la disposition des CRB par INRAE / RARE pour y parvenir ?

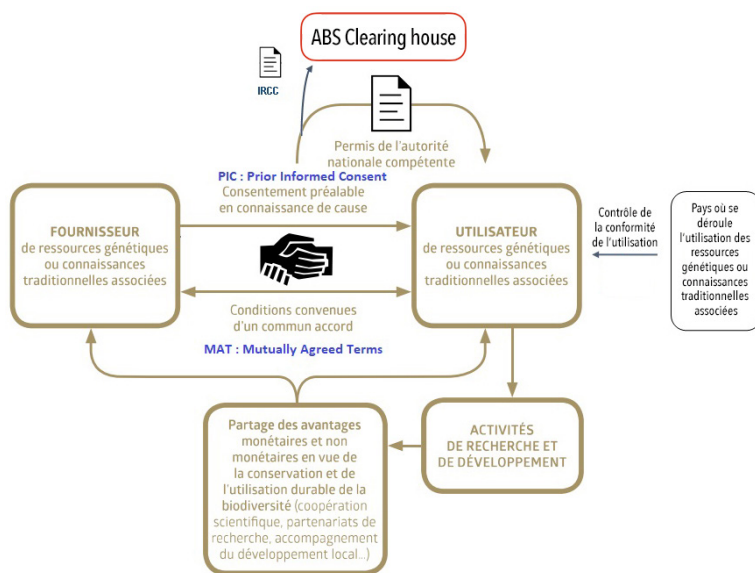
Rappel sur les dispositions d'APA et analyse des conséquences pour les chercheurs et les CRB

Pour comprendre dans quelle mesure les CRB sont concernés par les différentes réglementations sur l'APA, il est nécessaire de faire un rappel sur ces réglementations et les dispositions qu'elles prévoient.

La CDB (Convention sur la diversité biologique)

La CDB (<https://www.cbd.int/>) a été conçue dans un contexte de constat de perte de biodiversité au niveau mondial, de lutte contre la biopiraterie, et de montée de revendications de peuples autochtones. Elle réaffirme explicitement que les États ont des droits souverains sur leurs ressources biologiques et qu'ils peuvent, de ce fait, déterminer l'accès à leurs ressources génétiques par la législation nationale, mettant ainsi fin au libre accès qui prévalait auparavant.

La CDB compte 196 Parties à ce jour, dont la France et l'Union européenne. Ses trois objectifs sont : la conservation de la diversité biologique, l'utilisation durable de ses éléments constitutifs et le partage juste et équitable des avantages découlant de l'exploitation des ressources génétiques. Le troisième objectif contribue aux deux premiers. Il repose sur la mise en place d'un cercle vertueux dans lequel un utilisateur d'une RG obtient l'accord du pays d'origine pour l'accès à celle-ci puis négocie, avec le pays fournisseur et/ou une communauté autochtone et locale, le partage des avantages (ou bénéfices) qui permettront de contribuer à la préservation de la biodiversité (Figure 1). Le partage équitable des avantages découlant de l'utilisation des connaissances, innovations et pratiques des communautés autochtones et locales est également pris en considération (article 8.j de la CDB).



d'après l'APA pas à pas (FRB, 2017)

Figure 1. Schéma du principe de l'APA

Le protocole de Nagoya

Si les principes de l'APA sont bien inscrits dans la CDB, les mécanismes n'y sont pas vraiment précisés. De ce fait, l'APA n'a pas été mis en œuvre systématiquement à partir de l'entrée en vigueur de la CDB ; la sécurité juri-

² <https://absch.cbd.int/fr/>.

³ À la date du 30 mars 2022.

dique n'était donc pas correctement assurée, tant pour les pays d'origine que pour les utilisateurs, par manque de transparence et de traçabilité des échanges et des accords. Le « protocole de Nagoya sur l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation, relatif à la convention sur la diversité biologique » a été adopté le 29 octobre 2010, après 6 années de négociations, pour combler ces lacunes. Il est entré en vigueur le 12 octobre 2014. Il s'applique aux RG d'origine animale, végétale, microbienne ou autre qui entrent dans le champ d'application de la CDB ainsi qu'aux connaissances traditionnelles associées à ces RG (CTA).

Le protocole de Nagoya apporte en particulier les principaux éléments suivants par rapport à la CDB :

- il définit ce qu'il faut entendre par « **utilisation des ressources génétiques** » : les activités de recherche et de développement sur la composition génétique et/ou biochimique de ressources génétiques, notamment par l'application de la biotechnologie ;
- il mentionne les « **dérivés** » dans les définitions (les dérivés sont également concernés par l'APA) ;
- il exclut du champ d'application les ressources couvertes par d'autres instruments internationaux d'APA conformes au protocole, tel que le Traité international sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture (**TIRPAA**) (FAO, 2001) ;
- il précise les étapes de l'accès aux ressources génétiques mentionnées à l'article 15 de la CDB : accord préalable en connaissance de cause (APCC) ou *Prior Informed Consent* (**PIC**), et établissement des conditions convenues d'un commun accord (CCAC) ou *Mutually Agreed Terms* (**MAT**) pouvant inclure le partage des avantages ; ceux-ci peuvent être monétaires ou non monétaires (une liste non exhaustive d'avantages monétaires et non monétaires est annexée au protocole) ;
- chaque Partie s'engage à établir des **règles et des procédures claires, équitables et non arbitraires** incluant la mise à disposition des informations, la décision écrite d'une autorité nationale compétente, la délivrance d'un permis ou équivalent, et la notification en conséquence au Centre d'échanges sur l'accès et le partage des avantages (ABS-CH, voir ci-dessous) ;
- il prend en considération les situations d'urgence ;
- chaque Partie doit désigner un **correspondant national** pour l'APA (ou point focal national) qui fournit les informations nécessaires aux demandeurs d'accès ;
- chaque Partie doit désigner une ou plusieurs **autorités compétentes** chargées d'accorder l'accès et de délivrer la preuve écrite que les conditions d'accès ont été respectées ;

Ne relèvent pas de l'APA :

- les ressources génétiques humaines ;
- les ressources génétiques couvertes par des instruments internationaux spécifiques (TIRPAA, PIP (cadre de préparation de l'OMS en cas de grippe pandémique pour les virus de la grippe) ;
- les ressources génétiques se trouvant hors de la souveraineté d'un seul État (haute mer, Antarctique) ;
- les utilisations autres que la R&D : utilisation comme matière première, usage domestique, etc.

- il crée le Centre d'échange sur l'APA (*Access and Benefit Sharing-Clearing House* ou **ABS-CH**) où l'on trouve les informations fournies par chaque Partie, notamment la réglementation nationale, le correspondant national et la ou les autorités nationales compétentes, et tous les permis ou documents équivalents délivrés ;
- il ajoute un **pilier « conformité »** par lequel chaque Partie prend les mesures adéquates pour s'assurer que l'accès aux RG utilisées sous sa juridiction a été effectué conformément aux règles d'APA du pays d'origine. Autrement dit, ce sont **les autorités du pays où se trouve l'utilisateur qui contrôlent la conformité aux règles d'accès** du pays fournisseur de la RG, en désignant un ou des « **points de contrôle** » auxquels les utilisateurs doivent fournir les informations sur l'accès aux RG qu'ils utilisent. Ces informations sont ensuite transmises au pays d'origine ;
- il précise les renseignements que doit contenir au minimum le certificat de conformité reconnu à l'échelle internationale (*Internationally Recognized Certificate of Compliance* ou **IRCC**), qui prouve que l'accès a été accordé conformément aux règles du pays fournisseur. L'IRCC est établi par le pays fournisseur à partir des informations non confidentielles des documents PIC et MAT.

Le protocole de Nagoya vise donc à formaliser le cercle vertueux mis en place par la CDB et il instaure, en plus des piliers « accès » et « partage des avantages », un 3e pilier à l'APA : le pilier « contrôle de conformité » de l'utilisation des RG par les autorités du pays où se déroulent les activités de recherche.

Les réglementations subséquentes

L'Union européenne et la France sont Parties au protocole et doivent en appliquer les dispositions.

L'UE et le RE 511/2014 : pilier conformité

L'Union européenne a harmonisé les mesures concernant le pilier « conformité » du protocole de Nagoya sur son territoire. C'est l'objectif du règlement (UE) N° 511/2014 dont l'application directe s'impose à tous les États membres. Ce règlement est complété par le règlement d'exécution (UE) 2015/1866 et un document d'orientation qui apporte des précisions importantes sur l'interprétation du règlement et dont la consultation est très éclairante.

Le règlement 511/2014 s'applique lorsque le pays fournisseur de la RG est Partie au protocole, qu'il a des règles et procédures d'APA et que l'accès à la RG a eu lieu après la date d'entrée en vigueur du protocole pour l'Union (12 octobre 2014) (cf. [l'arbre de décision](#) en annexe I du document d'orientation).

Les principales dispositions du règlement sont les suivantes :

- L'utilisateur doit tout mettre en œuvre pour s'assurer que l'accès aux RG et CTA qu'il utilise est conforme à la réglementation APA applicable (donc du pays fournisseur) et qu'il possède les documents pertinents : c'est l'obligation de **diligence nécessaire** (*due diligence*). En cas de doute sur la légalité de l'accès, l'utilisation de la ressource doit cesser.
- Le transfert et l'utilisation des RG se font uniquement selon les conditions convenues d'un commun accord, si celles-ci sont requises par la réglementation applicable.
- L'utilisateur doit **obtenir, conserver et transférer aux utilisateurs ultérieurs l'IRCC ou, à défaut, les informations et documents pertinents relatifs à l'APA**.
- Les informations et documents relatifs à l'APA doivent être **conservés pendant 20 ans** après la fin de l'utilisation de la RG.
- Une **déclaration de diligence nécessaire** (ou DDD pour *due diligence declaration*) doit être faite auprès de l'autorité compétente par un utilisateur bénéficiaire d'un financement d'un projet de recherche ou lors de la mise en marché d'un produit, afin de prouver que l'utilisation de la RG s'est faite légalement.
 - **En France**, dans le cas des projets de recherche bénéficiant d'un **financement** externe, la DDD se fait en ligne sur le site dédié du **ministère chargé de la recherche**.
 - S'il s'agit du stade de développement final d'un **produit mis en marché**, la DDD se fait auprès du **ministère chargé de l'environnement**.
- Si une ressource phylogénétique pour l'alimentation et l'agriculture non inscrite à l'annexe I du TIRPAA est acquise auprès d'un pays Partie au protocole qui considère

que ces RG sont soumises aux dispositions de l'accord type de transfert de matériel du TIRPAA, l'utilisateur est réputé avoir fait preuve de la diligence nécessaire.

- Des mesures spéciales sont mises en place en cas d'urgence sanitaire en ce qui concerne les délais pour obtenir les informations et documents relatifs à l'APA.
- Les États membres doivent mettre en place un système de contrôle du respect des obligations des utilisateurs, notamment de diligence nécessaire, et doivent prévoir des **sanctions** en cas de non-respect.
- Des outils complémentaires, destinés à faciliter les démarches aux utilisateurs, sont mis en place :
 - le **registre des collections** ;
 - la reconnaissance de **bonnes pratiques**.

L'inscription d'une collection (d'un CRB) au registre fait l'objet d'une procédure particulière commune à tous les États membres. **Un utilisateur qui acquiert une RG auprès d'une collection inscrite au registre est réputé avoir fait preuve de la diligence nécessaire.** Il n'a donc pas l'obligation de rechercher d'autres informations et documents relatifs à l'APA que ceux que lui transmet un CRB inscrit au registre de l'UE. En revanche, il doit examiner, à partir de ces informations et documents, ce qu'il lui est possible de faire ou pas avec la RG et, si nécessaire, revenir vers le pays fournisseur ; c'est le cas par exemple, s'il envisage une valorisation commerciale alors que les documents APA précisent que seule une utilisation en vue d'une recherche sans objectif commercial est autorisée. **Le recours à une collection enregistrée représente donc un gain de temps et une sécurité juridique très appréciables pour un utilisateur.**

Enfin les bonnes pratiques doivent aider les utilisateurs à s'acquitter de leur obligation de diligence nécessaire, et la mise en œuvre effective des bonnes pratiques sera prise en considération, par l'autorité compétente, lors des contrôles du respect des règles par un utilisateur. À ce jour, le [registre des bonnes pratiques](#) compte le code des bonnes pratiques du *Consortium of European Taxonomic Facilities* (CETAF).

Réglementation française : accès, partage des avantages, contrôle de conformité et application du RE 511/2014

La France a décidé d'adopter une réglementation nationale pour l'accès aux RG se trouvant sur le territoire national et pour le partage des avantages. Elle couvre la métropole et les territoires ultramarins, mais ne s'applique pas en Polynésie française et en Nouvelle-Calédonie, qui ont développé leurs propres réglementations, conformément à leurs statuts et leurs compétences. En outre, les dispositions relatives à l'utilisation des CTA s'appliquent uniquement à la Guyane et aux îles Wallis-et-Futuna.

Les règles d'APA sont inscrites dans le [titre V de la loi n° 2016-1087 du 8 août 2016 pour la reconquête de la biodiversité, de la nature et des paysages](#) (articles [L. 412-3 et suivants du code de l'environnement](#)) et dans le [décret 2017-848 du 9 mai 2017](#). Les sanctions pour non-respect de la réglementation sont également prévues : sanctions pénales lourdes, interdiction de solliciter une autorisation d'accès, remboursement du financement perçu.

Les RG exemptées ou exclues sont, outre celles qui sont exclues de l'APA (voir encadré précédent) : les micro-organismes prélevés en France métropolitaine jusqu'au 2 septembre 2022 (période d'expérimentation à la date de publication de cet article), les espèces modèles, les RG utilisées dans le cadre d'activités concourant à la sauvegarde des intérêts de la défense et de la sécurité nationale.

L'État français est fournisseur pour les RG sous souveraineté nationale ; les communautés d'habitants de Guyane et de Wallis-et-Futuna sont les fournisseurs pour les CTA qu'elles détiennent.

Les dispositions distinguent un régime général et des régimes spécifiques, ainsi que des exemptions ou exclusions. Les ressources génétiques exemptées ou exclues ne nécessitent aucune procédure. Pour les ressources génétiques relevant du régime général, l'utilisation sans objectif direct de développement commercial doit faire l'objet d'une déclaration, et l'utilisation avec un objectif direct de développement commercial doit faire l'objet d'une demande d'autorisation. L'utilisation de CTA de Guyane ou de Wallis-et-Futuna doit faire l'objet d'une demande d'autorisation. Les déclarations et demandes d'autorisation se font auprès du ministère de la transition écologique, qui est l'autorité compétente (en ligne ou avec un formulaire CERFA).

Un arrêté⁴ du MESRI (Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation) définit les espèces modèles, notamment les conditions d'utilisation permettant de les considérer comme telles, et établit leur liste.

Un décret en Conseil d'État pour les RG objets de sylviculture et des ordonnances pour les autres régimes spécifiques doivent préciser ces régimes et les procédures associées. Aucun de ces textes n'ayant été publié à l'heure actuelle, l'accès à ces RG n'est pas réglementé et ne nécessite aucune procédure.

L'utilisation à visée non commerciale de RG originaires de France, qui sont en collection avant la date

Les régimes spécifiques concernent :

- les RG issues d'espèces domestiquées ou cultivées (animaux, plantes, microorganismes) ;
- les RG des espèces végétales sauvages apparentées ;
- les RG objets de sylviculture régies par l'article L. 153-1-2 du code forestier ;
- les RG collectées par les laboratoires dans le cadre de la prévention, de la surveillance et de la lutte contre les dangers sanitaires concernant les animaux, les végétaux et la sécurité sanitaire des aliments ;
- les ressources génétiques collectées par les laboratoires au titre de la prévention et de la maîtrise des risques graves pour la santé humaine, régies par l'article L. 1413-8 du code de la santé publique.

de publication de la loi (9 août 2016) ne nécessite pas de formalité APA (article [L. 412-6 du code de l'environnement](#)). Si l'utilisation change (c'est-à-dire, dans le cadre de cet article, avec un objectif direct de développement commercial et dans un domaine d'activité distinct de celui précédemment couvert par le même utilisateur), il faut faire une demande d'autorisation.

Pour la mise en œuvre du pilier conformité et l'application du RE 511/2014, les autorités compétentes ont été désignées :

- Le ministère chargé de l'environnement pour les déclarations d'accès (accès aux RG pour la recherche fondamentale) et les demandes d'autorisation (accès aux RG pour une valorisation commerciale et accès aux CTA), déclaration de diligence nécessaire au stade du développement final d'un produit lors de mise en marché. Il transmet les informations reçues aux autorités nationales compétentes des pays fournisseurs ; il transmet les IRCC au site du protocole de Nagoya ABS-CH.
- Le ministère chargé de la recherche pour recevoir les DDD au stade du financement des projets de recherche bénéficiant de financements extérieurs à leur institution, pour le contrôle du respect des règles par les utilisateurs et la tenue du registre des contrôles effectués, et enfin, pour l'instruction des demandes d'inscription des collections au registre européen et la transmission de la liste des collections inscrites à la Commission européenne.

4 Arrêté du 3 septembre 2019 relatif aux espèces modèles - <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2019/9/3/ESRR1914569A/jo/texte>.

- Les provinces Nord, Sud et des Îles Loyauté de Nouvelle-Calédonie et la Polynésie française.

Le **point focal national** français est le **ministère chargé de l'environnement**.

INRAE : procédures, appui aux chercheurs

La [note de service 2019-66 du 9 juillet 2019](#) décrit les acteurs impliqués et les procédures mises en place en interne, à INRAE, pour effectuer les déclarations ou obtenir les autorisations d'accès aux ressources génétiques et aux CTA en vue de leur utilisation (cf. Figure 2).

La cellule APA d'INRAE, mise en place au niveau national, est composée d'un agent de RARe et d'un agent de la DAJ qui en assure le pilotage. La cellule APA est chargée de capitaliser les informations et l'expérience sur l'application des règles d'APA pour les différents cas de figure, de proposer des clauses-typiques pour les contrats de recherche et les accords de transfert de matériel en lien avec la direction Partenariat et transfert pour l'innovation (DPTI), de former et sensibiliser les services partenariat et les unités, d'accompagner les unités et les ingénieurs de projets en partenariat (IPP) pour gérer les cas complexes⁵.

La cellule APA a développé et enrichit régulièrement un site intranet (<https://sites.inrae.fr/site/maj/APA/SitePages/Accueil.aspx>) qui regroupe diverses ressources pour accompagner les agents INRAE dans la mise en œuvre de

l'APA (Figure 3). Le site se présente sous forme d'étapes pour guider de la façon la plus pratique possible l'utilisateur qui doit mettre en œuvre l'APA dans un projet ou pour un transfert de matériel.

La cellule APA est également joignable, pour les cas complexes, par messagerie électronique via l'alias : **apa@inrae.fr**.

Ce qu'il faut retenir : enjeux, conséquences pour les chercheurs et les CRB

Quelles sont les conséquences de l'entrée en vigueur du Protocole de Nagoya pour les chercheurs et gestionnaires de CRB ?

- La responsabilité des démarches APA pèse toujours sur celui qui conduit les travaux de R&D sur la ressource, c'est-à-dire le responsable scientifique d'un projet ou, pour un CRB, le déposant ou le tiers auquel le CRB transfère la RG.
- L'APA doit être systématiquement pris en compte lors du montage des projets et lors d'échanges de RG.
- L'APA s'ajoute aux autres réglementations en vigueur.
- Chaque pays, souverain sur ses RG, choisit de réglementer ou pas l'accès aux RG/CTA, de fixer le partage des avantages et de prévoir des sanctions pour non-respect des règles d'APA.

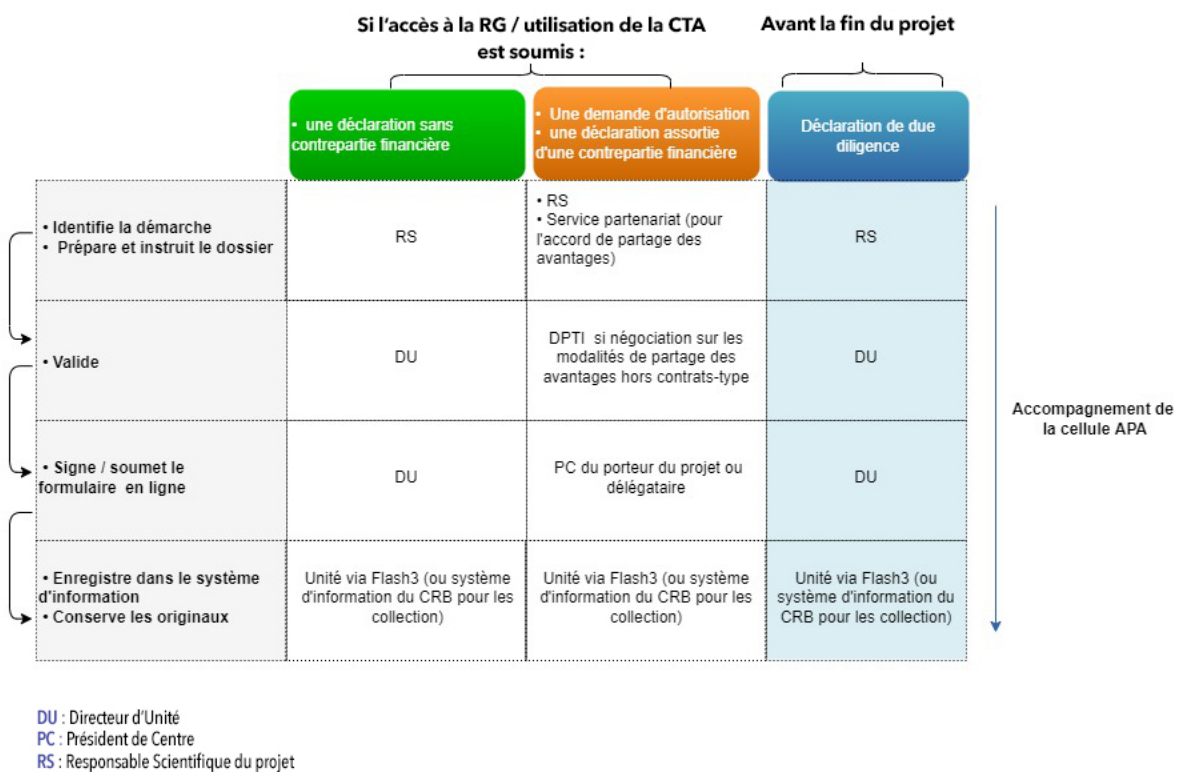


Figure 2. Résumé des procédures APA à INRAE

5 <https://sites.inrae.fr/site/maj/APA/SitePages/La%20cellule%20APA.aspx>.



Figure 3. Page d'accueil du site intranet APA d'INRAE

- Un pays peut adopter une réglementation APA même s'il n'est pas Partie au protocole de Nagoya, et a pu également l'adopter avant l'entrée en vigueur du protocole de Nagoya ; toute réglementation APA doit être respectée.
- Un pays ayant choisi de ne pas réglementer l'accès aux RG/CTA au titre de l'APA peut avoir d'autres réglementations contraignantes s'appliquant à des ressources biologiques (lois de protection de la nature, par exemple).
- Le règlement UE sur le protocole de Nagoya s'applique aux accès à des RG/CTA postérieurs à l'entrée en vigueur du protocole de Nagoya pour l'UE (12 octobre 2014), et uniquement si le pays fournisseur est Partie au protocole de Nagoya et possède des règles et procédures APA.
- Les règles à respecter dépendent, en tout premier lieu, de la réglementation APA du pays fournisseur ou d'origine et de la date d'accès à la RG / CTA.
- Les enjeux du respect des règles APA relèvent du domaine de l'éthique, de l'image de l'institution de recherche, de la sécurité juridique, des bonnes pratiques de recherche ; s'y ajoutent les difficultés pour l'accès aux financements (ou remboursement des montants), voire aux publications, en cas de non-respect des règles du pays d'origine, ainsi que le risque de sanctions pénales.
- Le règlement européen prévoit des outils visant à aider les utilisateurs à respecter leurs obligations, en particulier le **registre des collections** ; cette disposition concerne tout particulièrement les CRB qui peuvent y trouver un intérêt : du fait de la visibilité internationale qu'entraîne l'inscription au registre, disponible sur le site de la Commission européenne ; du fait que cette inscription répond à des exigences de qualité de la part du CRB inscrit et lui donne une image de professionnalisme ; et enfin, du fait de l'attractivité que représente un CRB

inscrit en raison du gain de temps et d'énergie pour l'utilisateur qui est réputé avoir fait preuve de la diligence nécessaire lorsqu'il acquiert une RG auprès d'une collection inscrite.

Les CRB doivent donc évaluer l'intérêt que peut procurer l'inscription au registre des collections, par rapport à l'investissement nécessaire au montage du dossier de demande d'inscription.

Trois collections sont inscrites au [registre européen](#), à ce jour, parmi lesquelles le CIRM-CFBP (INRAE), membre du GIS CIRM et de l'IR RARE.

Les objectifs de RARe sur l'APA, ou quelques bonnes raisons de se préoccuper de l'APA dans les CRB

La responsabilité des démarches APA incombe à l'utilisateur d'une ressource génétique. Or, les CRB ne sont pas des utilisateurs au sens du protocole de Nagoya, dans la mesure où, en général, ils ne conduisent pas d'activité de recherche sur les ressources génétiques. La réglementation nationale d'un pays d'origine peut cependant en disposer autrement, comme le Cameroun par exemple, qui considère que la conservation est une [utilisation](#) (article 3 de [la loi 2021/014](#) du 9 juillet 2021). Cependant, pour la Commission européenne ([point 2.3.3.1. du document d'orientation cité plus haut](#)), les activités nécessaires pour le contrôle qualité ou pour des besoins de taxonomie d'une collection n'entrent pas dans le champ des activités de recherche (et n'entrent donc pas dans le champ d'application du RUE 511/2014). Il faut noter, toutefois, que les activités liées à la taxonomie peuvent, là encore pour certains pays, constituer une utilisation.

Ce sont donc, dans la plupart des cas, les déposants ou les tiers auxquels les CRB transfèrent des ressources gé-

nétiques qui sont utilisateurs et qui doivent effectuer les démarches si elles sont requises.

Toutefois, les CRB ont de bonnes raisons de se préoccuper du statut vis-à-vis de l'APA des RG qu'ils conservent :

- Ils doivent être en mesure de distribuer des ressources en toute sécurité juridique, que ce soit pour eux-mêmes ou pour les tiers qui reçoivent ces ressources.

Tout CRB doit donc au **moins savoir** :

- **s'il a le droit de détenir la RG** ;
- **si le transfert à un tiers est autorisé⁶, et être en mesure de préciser à ce tiers le statut de la RG vis-à-vis de l'APA**, afin qu'il sache s'il peut l'utiliser ou s'il doit préalablement faire des démarches auprès du pays fournisseur.
- La conformité à l'APA doit être respectée pour bénéficier de **financements** extérieurs, notamment nationaux ou de l'UE (obligation de diligence nécessaire et de déclaration avant la fin du projet financé) et, de plus en plus, pour être publié, car les éditeurs scientifiques sont attentifs au respect de l'APA.
- Pour être membre de RARe, tout CRB doit être **certifié** ou labellisé IBiSA. La certification ISO 9001 porte, en particulier, sur le **respect des réglementations applicables** par l'entité certifiée (chapitre 8, voir notamment « 8-2-2 : détermination des exigences relatives aux produits et services »). Cela inclut la conformité à l'APA ; le statut des ressources conservées doit donc être connu.
- Il s'agit également de **faciliter la réutilisation des ressources**, notamment par la gestion appropriée des données et de la documentation relevant de l'APA, pour assurer leur traçabilité.
- Enfin, RARe s'est doté **d'indicateurs**, parmi lesquels le **nombre de CRB inscrits sur le registre européen**, afin de satisfaire un de ses objectifs en matière de visibilité internationale dans le domaine de la biodiversité.

Au-delà de ces arguments essentiellement de type réglementaire, il convient de garder à l'esprit la préservation de la biodiversité et les aspects éthiques, notamment le partage des avantages, qui sont à la base de la CDB et du protocole de Nagoya. Les CRB, comme toute autre composante d'INRAE, ont chacun un rôle à jouer dans l'image de l'institution et l'acceptation sociétale de la recherche sur les ressources génétiques. Le partage des avantages peut d'ailleurs être mis en place même s'il ne découle pas d'obligations réglementaires (transfert de technologies, association aux publications, formations, contribution à des actions de préservation...). De plus, les aspects « stratégiques » vis-à-vis des pays fournisseurs, les politiques des tutelles concer-

nant les partenariats internationaux entrent en ligne de compte dans les décisions de mise en conformité à l'APA.

Pour conclure, il est donc indispensable de mettre en œuvre l'APA dans les CRB et de s'efforcer d'être en conformité sur l'ensemble des ressources des CRB de RARe. En tout état de cause, s'il peut être difficile de régulariser le statut APA de certaines ressources déjà présentes en collection, **toute nouvelle entrée en collection doit désormais se faire dans le respect des règles APA applicables à la ressource génétique considérée.**

Atteindre ces objectifs suppose :

- que les gestionnaires des CRB et leurs équipes soient formés sur l'APA ;
- que les gestionnaires des collections des CRB disposent d'outils d'aide à la décision ;
- que les bases de données des CRB permettent aux gestionnaires de disposer des données nécessaires à l'évaluation du statut des ressources vis-à-vis de l'APA et de gérer toute la documentation liée à l'APA et à la traçabilité des ressources et des données ;
- que les bases de données des CRB permettent aux utilisateurs de connaître les conditions d'utilisation des RG du catalogue et les démarches liées à l'APA qu'ils devraient éventuellement entreprendre ;
- et que les CRB soient appuyés, si possible, pour l'élaboration d'un dossier de demande d'inscription au registre européen des collections.

Pour répondre à ces besoins, RARe a mis en place un projet financé par le GIS IBiSA : « ABS4BRCs » piloté par le Cirad, auquel fait suite un groupe de travail transversal sur la mise en œuvre de l'APA, le « GT APA ».

Le GT APA actuel est composé d'un animateur et d'un représentant de chaque pilier de RARe :

- Didier Bouchel, animateur ;
- Céline Faivre-Primot, représentante du pilier environnement ;
- Barbara Lacor, représentante du pilier forêt ;
- Najate Maghnaoui, représentante du pilier plante ;
- Michel Naves, représentant du pilier animal ;
- Perrine Portier, représentante du pilier micro-organismes.

Dans la suite de l'article, « GT APA » sera utilisé pour désigner indifféremment ABS4BRCs ou le GT APA actuel.

6 Les restrictions de diffusion peuvent être dues aux mentions portées sur le PIC ou le MAT, ou d'autres causes comme l'accord préalable du déposant du matériel génétique. On peut noter que la collection DSMZ, inscrite au registre des collections, impose à ses déposants que le dépôt dans cette collection publique et le transfert à des tiers en vue d'activités de recherche scientifique non commerciale soient autorisés (<https://www.dsmz.de/collection/nagoya-protocol/strain-deposit>).



Figure 4. Outil d'aide à la décision ABS_Assist, exemple d'une interrogation pour du matériel génétique du Brésil

Outils développés et actions menées par le GT APA

Le GT APA de RARe oriente ses actions spécifiquement pour répondre aux contraintes des CRB, en complémentarité avec le travail des cellules APA des instituts.

Ses objectifs sont d'apporter un appui aux piliers et aux CRB pour se mettre en conformité avec l'APA, pour être en capacité de demander leur inscription au registre des collections, ainsi que d'organiser les formations nécessaires.

Développement et mise en œuvre d'outils pour les CRB

Deux outils ont été développés et mis à la disposition de la communauté scientifique : un guide sur l'APA destiné aux gestionnaires de CRB, et un arbre de décision pour déterminer le statut APA d'une ressource génétique ou d'une connaissance traditionnelle associée.

Guide de l'APA pour les CRB

Ce guide (version v2) est en accès public et téléchargeable à l'URL <https://www.projet-abs4brcs.fr/Boite-a-outils-APA/Guide>.

Il comporte :

- des fiches pratiques pour déterminer quelle procédure appliquer dans différentes situations : l'accès à une ressource génétique, l'utilisation d'une ressource génétique et la diffusion d'une ressource génétique ; des fiches explicatives pour préciser certaines notions : le système multilatéral du TIRPAA, la réglementation française en matière d'APA, le mécanisme de l'APA, the ABS-Clearing House ;
- une boîte à outils : méthode d'inventaire des informations liées aux RG, modèles de mails en français, anglais et espagnol, clauses d'APA pour MTA en français et en anglais, fiche de suivi de projet.

Outil logiciel d'aide à la décision : ABS_Assist

Également en accès public à l'URL http://golo.cirad.fr/ABS4BRC_WEB, cet outil permet de déterminer le statut APA d'une ressource ou les démarches à entreprendre pour accéder à une ressource génétique en vue de son utilisation (Figure 4). Les CTA sont également prises en compte par le logiciel. Il en est de même pour les ressources phytogénétiques échangées dans le cadre du traité international sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture (TIRPAA), accompagnées d'un accord type de transfert de matériel (ATTM ou *sMTA* en anglais).

L'arbre de décision est adossé à une base de connaissances sur les réglementations nationales relatives à l'APA.

Attention : il s'agit d'un outil d'aide à la décision, mais il n'a pas de valeur juridique. Son utilisation ne dispense pas de faire confirmer les conclusions par les personnes en charge des questions APA dans chaque établissement, en cas de doute. En effet, bien que les informations soient mises à jour régulièrement, il est toujours possible qu'une information soit erronée ou obsolète au moment où l'outil est utilisé.

Certains instituts, comme INRAE, disposent également d'outils type arbre de décision s'appuyant sur une base pays. Il est prudent de croiser ces informations entre elles et avec les informations officielles disponibles sur le site du protocole de Nagoya ABS-CH (<https://absch.cbd.int/fr/>).

Mise en œuvre de la conformité à l'APA dans les CRB

Données liées à l'APA dans les systèmes d'information des CRB

Pour déterminer le statut d'une ressource génétique détenue par un CRB, il est nécessaire de disposer des informations et des documents pertinents : pays fournisseur, pays d'origine s'il est différent, date d'accès, nature de la RG ainsi que les documents liés à l'APA s'ils sont requis

Tableau 1 : Résultats de l'enquête sur l'état des lieux des données APA dans les systèmes d'information des CRB (en pourcentages)

		RARE (43 réponses)	
champ	libellé	présent (%) *	% renseigné **
1	description RG	86	92
2	pays d'origine	88	86
3	pays de provenance	86	90
4	lieu de prélèvement hors juridiction nationale ***	21	sans objet
5	provenance <i>ex-situ</i>	63	72
6	provenance collection enregistrée UE	0	0
7	date d'accès à la RG	88	83
8	date d'isolement (uniquement microorganismes = MO)	100 pour MO	76
9	date d'entrée en collection (MO)	81	91
10	RG soumise au TIRPAA	****	72
11	champ permettant de déterminer si RG non soumise à l'APA	26	non demandé
12	statut de la RG vis-à-vis de la réglementation APA	26	% conforme 68
13	dernière date de détermination du statut APA	11	
présence de documents dans le SI ou liens univoques dans le SI vers les documents			
	PIC, MAT, IRCC ou autres	30	48
	autres preuves d'accès et documents de traçabilité	42	66
	liste des utilisateurs ultérieurs	42	77
	preuve de transmission des documents APA aux utilisateurs ultérieurs	40	87
dispositions prises pour conservation documents pendant 20 ans		23	sans objet

* : colonne "présent (%)" : pourcentage des collections pour lesquelles le champ est présent dans le SI, par rapport au nombre de collections dans RARE ou dans le pilier concerné

** : colonne "% renseigné" : lorsque le champ existe, donne le pourcentage moyen de renseignement du champ dans la base de données (moyenne calculée sur les CRBs ayant répondu à cette question)

*** champ 4 : la question était ainsi rédigée : "merci de préciser si ce descripteur (pays d'origine) permet de savoir, le cas échéant, qu'une RG a été prélevée hors de toute juridiction nationale (donc exclue de l'APA)

Il peut donc s'agir d'un champ ou d'une possibilité de valeur de la variable du champ "pays d'origine"

**** : non renseigné intentionnellement car le nombre de CRBs théoriquement concernés dans le pilier plante n'a pas été déterminé

(PIC, MAT, IRCC et autres permis le cas échéant). Les informations peuvent être différentes selon les types de ressources. Ainsi, les informations relatives au TIRPAA ne concernent que les ressources phylogénétiques ; la distinction entre date de prélèvement et date d'isolement est pertinente pour les micro-organismes. À noter également que, dans certains pays, ce sont les États fédérés ou provinces ou régions qui sont compétents en matière d'APA (Espagne, par exemple) ; dans ce cas, il est important de connaître le lieu d'origine le plus précisément possible.

Une liste de ces données et documents a donc été établie sur la base de l'analyse des choix soumis dans les arbres de décision existants, de la réglementation internationale, européenne et nationale, y compris dans la perspective d'une éventuelle demande d'inscription au registre des collections de l'UE.

Une enquête a été menée auprès des gestionnaires des CRB de RARE pour recenser les champs (ou « descripteurs ») correspondants dans leurs systèmes d'information (SI). D'autres questions concernaient la présence d'un champ permettant de connaître le statut APA d'une ressource (connu et conforme, connu et non conforme, non déterminé) ainsi que la dernière date de détermination de ce statut, éventuellement un champ permettant de déterminer si la RG n'est pas soumise à l'APA (ex. : espèce

modèle, espèce domestiquée pour les RG sous juridiction française), et la liste des utilisateurs de cette RG.

Par ailleurs, des questions relatives au lien entre une ressource et les documents APA s'y rapportant, à la preuve de transmission de ces documents aux utilisateurs ultérieurs en cas de transfert de la RG, ainsi qu'aux dispositions prises pour la conservation des documents APA pendant au moins 20 ans après la fin de l'utilisation, ont été posées. Le taux de renseignement des champs, lorsqu'ils sont présents dans le SI, était également demandé.

Les résultats de cette enquête sont synthétisés dans le tableau 1. Sur l'ensemble des champs, la description de la RG, le pays d'origine ou de provenance et la date d'accès à la RG sont les plus fréquemment présents dans les SI, à près de 90 % ; le taux de renseignement est similaire. Cependant, seuls 26 % des CRB présentent, dans leur SI, un champ qui permet d'indiquer quel est le statut de la RG vis-à-vis de la réglementation APA.

Par ailleurs, dans 30 % des cas seulement, le SI du CRB permet de relier les documents APA (PIC, MAT, IRCC) aux RG concernées, que les documents soient stockés directement dans le SI ou qu'une référence permette d'accéder de façon univoque aux documents archivés dans un autre système. Le pourcentage est de 42 % pour les

autres preuves d'accès et documents de traçabilité, ce qui semble modeste dans la mesure où cela inclut les MTA.

Enfin, 23 % des CRB ont pris des dispositions pour respecter la durée de conservation des documents APA pendant 20 ans, conformément au règlement européen 511/2014.

Il est donc important de mieux intégrer, dans le SI des CRB, les champs et descripteurs nécessaires à la conformité à l'APA et à la gestion des documents liés à l'APA.

C'est pourquoi, sur la base de ces résultats d'enquête, les groupes de travail de RARe sur l'APA et sur les SI ont commencé un travail conjoint afin que les SI évoluent dans ce sens.

Autres actions

- À la demande de l'animateur du pilier environnement, une fiche thématique a été rédigée avec ce dernier pour le réseau d'écotoxicologie terrestre et aquatique ECOTOX (Bouchel *et al.*, 2020).
- Des visites de CRB par l'animateur du GT APA sont prévues, mais ont été retardées en raison de la pandémie.
- Au cours de l'AG 2020 de RARe, le CIRM-CFBP dont la partie « conforme à l'APA » de sa collection est inscrite au registre des collections de l'UE, a présenté la méthode adoptée pour déterminer le statut APA de ses ressources déjà en collection (pour les nouvelles ressources, ne sont acceptées que celles dont le statut APA est conforme).

Elle suppose la définition de priorités, qui dépendent de chaque CRB.

Il s'agit d'examiner tout d'abord les pays d'origine et les dates **pour lesquels on sait qu'aucune démarche n'est nécessaire**. C'est le cas, par exemple, de l'Allemagne, des Pays-Bas ou du Royaume-Uni, quelle que soit la date ; de l'Espagne avant l'entrée en vigueur de sa loi sur l'APA, c'est-à-dire le 15 mars 2017, ou encore pour les micro-organismes prélevés en France métropolitaine avant le 2 septembre 2022. Le statut de ces ressources est donc d'emblée « **connu-conforme** ». C'est aussi le cas des ressources n'entrant pas dans le champ d'application de l'APA : ressources génétiques humaines, ressources prélevées en haute mer, ressources échangées sous le régime du TIRPAA.

Les autres cas doivent être traités selon une analyse de risque. La priorité peut être axée sur les pays d'origine les plus représentés dans la base de données, ou les plus fréquents pour les RG distribuées ou acquises par le CRB au cours des derniers mois ou années. Il est possible également de cibler les pays dont les démarches sont moins complexes ou les mieux décrites dans les sources d'information. Ainsi, on peut se baser sur le code couleur adopté dans la base pays sur Sharepoint de la cellule APA INRAE (<https://sites.inrae.fr/site/maj/APA/SitePages/Base%20Pays.aspx>) qui rappelle le niveau d'information disponible ainsi que les points de vigilance éventuels.

Il peut être nécessaire de rechercher d'autres informations pouvant apporter des éléments de preuve sur l'origine et la date d'entrée en collection des ressources (archives, publications, carnets de laboratoire, certificats sanitaires...).

En cas de doute, ou s'il apparaît que le statut ne peut pas être considéré comme « conforme », il convient de contacter le point focal national du pays d'origine pour régulariser la situation de la ressource.

Il convient toutefois de noter que la Commission européenne a rappelé, au [point 3.3. de son document d'orientation](#) cité plus haut, que l'absence d'informations sur une ressource génétique, malgré tous les efforts déployés, n'interdit pas son utilisation ; cependant si, en cours d'utilisation, l'utilisateur a connaissance d'informations nouvelles permettant de déterminer l'origine de cette ressource, il doit obtenir un permis d'accès et établir les conditions convenues d'un commun accord, ou alors cesser l'utilisation.

Enfin, cette démarche de priorisation et d'analyse de risque peut aussi être l'occasion de s'interroger sur l'intérêt de conserver certaines ressources.

- L'utilisation d'extractions de la base pays d'ABS_Assist pour déterminer le statut APA des RG d'un CRB est en cours d'évaluation par l'équipe du projet ABS4BRCs. La méthodologie sera présentée au GT APA, début 2022, dans l'optique de l'étendre à un maximum de CRB au cours des mois suivants.

Formations

L'APA et ses implications pour les CRB

Une formation a été dispensée, en mars 2020 et janvier 2021 dans le cadre du projet ABS4BRCs, aux responsables des CRB de RARe. La deuxième session a dû se dérouler en distanciel, contrairement à la première, dans le contexte sanitaire de la Covid-19.

La formation a abordé les principes généraux de l'APA, les réglementations existantes y compris au niveau français, la réglementation propre au TIRPAA, les risques liés à la gestion de ressources génétiques, les bonnes pratiques pour la mise en œuvre de l'APA dans les CRB et les outils développés par le projet. Des mises en situation ont permis de cerner les difficultés concrètes de mise en œuvre et d'appliquer les principes acquis pendant les exposés.

Formation pour la mise à jour du logiciel ABS_Assist

De nombreux pays ont ratifié et sont Parties au protocole de Nagoya, mais certains n'ont pas encore adopté de réglementation sur l'APA ou n'ont pas fixé les démarches as-

sociées, ou sont en train de le faire, ou encore font évoluer une réglementation adoptée depuis plusieurs années. Il est donc nécessaire de faire une veille réglementaire et d'adapter en permanence les connaissances mises en ligne, à l'aide d'outils, sur les sites APA des instituts. Les membres des cellules APA des instituts de recherche et en particulier d'INRAE, du Cirad et de l'IRD pratiquent cette veille ; étant fréquemment sollicités pour résoudre des cas plus ou moins complexes, ils sont appelés à vérifier au fil de l'eau les informations disponibles et capitalisent l'expérience acquise dans les différents cas de figure en fonction des pays. Sans cet effort permanent, les outils et bases de connaissances deviendraient rapidement obsolètes, donc peu efficaces, voire risqueraient d'induire en erreur les utilisateurs. Il en est de même pour l'outil ABS_Assist, dont l'accès est public, qui doit être mis à jour en continu. L'objectif étant de mettre à disposition de l'ensemble de la communauté scientifique (non limitée à RARe) une ressource fiable et aussi exhaustive que possible, le choix a été fait de mutualiser les connaissances et l'expérience de ce groupe d'experts.

Pour permettre à ce groupe restreint de mettre à jour les informations sur les pays et de modifier en conséquence les arbres sous-jacents au logiciel pour les adapter aux évolutions réglementaires, l'équipe du projet ABS4BRCs a formé les membres du GT APA de RARe ainsi que des membres des cellules de coordination des principaux instituts (INRAE, Cirad, IRD) aux fonctionnalités « administrateur » de la base de connaissances sur les réglementations APA des pays et des arbres de décision du logiciel ABS_Assist. Cette formation s'est déroulée en septembre 2021 en distanciel.

Formation pour l'élaboration des dossiers de demande d'inscription au registre des collections de l'UE.

Le nombre de CRB inscrits au registre des collections de l'UE est un des indicateurs de performance de RARe. C'est pourquoi il est prévu de former les responsables des CRB à l'élaboration d'une demande d'inscription au registre, sous forme d'une première session théorique sur les exigences réglementaires et d'une deuxième session d'analyse des dossiers que les CRB auront préparés entre temps. Cette formation est prévue en 2022. Elle s'appuiera, notamment, sur l'expérience de gestionnaires de CRB membres du groupe d'experts rendant l'avis sur les dossiers de demande au MESRI et/ou de responsables de CRB ayant présenté avec succès un dossier.

Conclusion

La mise en œuvre de la réglementation sur l'APA peut s'avérer complexe pour un CRB, mais elle est incontournable pour qu'il puisse distribuer les ressources génétiques qu'il détient en toute sécurité juridique pour lui-même et pour ses utilisateurs. Elle nécessite de disposer d'informations qui doivent être présentes dans son SI. L'infrastructure RARe s'est dotée d'un projet, puis d'un groupe de travail transversal pour appuyer ses CRB et leur permettre de mettre en conformité leurs ressources génétiques et, à terme, de demander leur inscription au registre des collections de l'UE, qui est l'un des objectifs de RARe. ■

Remerciements

Nous remercions Micaël Aliouat (DAJ, cellule APA INRAE), Céline Faivre-Primot (GT APA, GenoSol), Barbara Lacor (GT APA, CRB Forêts) et Perrine Portier (GT APA, CIRM-CFBP) pour leur relecture attentive du manuscrit.

Références

ABS_Assist. Outil d'aide à la décision en matière d'APA. Projet ABS4BRCs. http://golo.cirad.fr/ABS4BRC_WEB.

Arrêté du 3 septembre 2019 relatif aux espèces modèles. JORF n°0231 du 4 octobre 2019. <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2019/9/3/ESRR1914569A/jo/texte>.

Bouchel D, Aliouat M and Mougin C (2020). La réglementation sur les ressources génétiques : quelles conséquences pour les recherches en écotoxicologie ? hal-03144264 (<https://hal.inrae.fr/hal-03144264>).

Centre d'échange sur l'accès et le partage des avantages. <https://absch.cbd.int/fr/>.

Code de l'environnement. https://www.legifrance.gouv.fr/codes/texte_lc/LEGITEXT000006074220?etatTexte=VIGUEUR.

Décret n° 2017-848 du 9 mai 2017 relatif à l'accès aux ressources génétiques et aux connaissances traditionnelles associées et au partage des avantages découlant de leur utilisation. JORF n°0109 du 10 mai 2017. <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000034630780>.

Document d'orientation sur le champ d'application et les obligations essentielles du règlement (UE) n° 511/2014 du Parlement européen et du Conseil du 16 avril 2014 relatif aux mesures concernant le respect par les utilisateurs dans l'Union du protocole de Nagoya sur l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation (2021/C 13/01). https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=uriserv:OJ.C_.2021.013.01.0001.01.FRA.

FAO (2001). Traité international sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture. Rome. <https://www.fao.org/3/i0510f/i0510f.pdf>.

Fondation pour la recherche sur la biodiversité (2017). L'APA pas à pas. FRB, 142 p. <https://www.fondationbiodiversite.fr/les-enjeux-de-la-biodiversite/biodiversite-et-reglementation/zoom-apa/>.

Guide de la mise en œuvre de l'APA pour les CRB. Projet ABS4BRCs. <https://www.projet-abs4brcs.fr/Boite-a-outils-APA/Guide>.

Loi n° 2016-1087 du 8 août 2016 pour la reconquête de la biodiversité, de la nature et des paysages. JORF n°0184 du 9 août 2016. <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/loi/2016/8/8/2016-1087/jo/texte>.

Nations Unies (1992). Convention sur la diversité biologique. Montréal. <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-fr.pdf>.

Nations Unies (2010). Protocole de Nagoya sur l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation relatif à la Convention sur la diversité biologique. Montréal. <https://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-fr.pdf>.

Règlement (UE) N° 511/2014 du Parlement européen et du Conseil du 16 avril 2014 relatif aux mesures concernant le respect par les utilisateurs dans l'Union du protocole de Nagoya sur l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation. <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/511/oj/fra>.

Règlement d'exécution (UE)2015/1866 de la Commission du 13 octobre 2015 portant modalités d'application du règlement (UE)n° 511/2014 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne le registre des collections, la surveillance du respect des règles par l'utilisateur et les bonnes pratiques. http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2015/1866/oj/fra.

Site APA INRAE. <https://sites.inrae.fr/site/maj/APA/SitePages/Accueil.aspx>.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

BioloMICS : Un outil pour gérer les données associées aux collections des Centres de Ressources Biologiques

Emmanuelle ARTIGE¹

Cécile GRONDIN²

Jonathan MINEAU³

Michel-Yves MISTOU⁴

CORRESPONDANCE

michel-yves.mistou@inrae.fr

emmanuelle.artige@inrae.fr

RÉSUMÉ

Le logiciel commercial Biologics permet de créer une base de données relationnelle et de déployer un site web associé. Il a été choisi par plusieurs CRB de RARe pour la gestion de leurs collections. Nous faisons ici une revue extensive des fonctionnalités du logiciel, des avantages de la solution et de ses limites.

MOTS-CLÉS

Biologics, logiciel, collection, base de données, site web.

1 CBGP, INRAE, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ Montpellier, Montpellier, France.

2 CIRM-Levures, SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France.

3 CIRM, SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France.

4 CIRM, Université Paris-Saclay, INRAE, UMR 1404 MalAGE, Jouy-en-Josas, France.

BioloMICS: a tool for generating data associated with the collections of the Biological Resource Centres

Emmanuelle ARTIGE¹

Cécile GRONDIN²

Jonathan MINEAU³

Michel-Yves MISTOU⁴

CORRESPONDENCE

michel-yves.mistou@inrae.fr

emmanuelle.artige@inrae.fr

ABSTRACT

The commercial software BioloMICS allows creating a relational database and deploying an associated website. It was chosen by several BRCs of the RARe to manage their collections. Here, we provide an extensive review of the software's functionalities, the advantages of the solution and its limits.

KEYWORDS

BioloMICS, software, collection, database, website.

¹ CBGP, INRAE, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ Montpellier, Montpellier, France.

² CIRM-Levures, SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France.

³ CIRM, SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France.

⁴ CIRM, Université Paris-Saclay, INRAE, UMR 1404 MalAGE, Jouy-en-Josas, France.

Introduction

Les centres de ressource biologiques (CRB) doivent fournir à leurs utilisateurs des échantillons identifiés selon des standards qui évoluent avec les développements technologiques, scientifiques et réglementaires. La multiplication des informations associées aux ressources biologiques (métadonnées, données moléculaires et phénotypique, conformité réglementaire, sécurité biologique, images, etc.), leur mise à jour et leur visibilité imposent aux CRB à la fois de mettre en place des outils dédiés pour la gestion de leurs catalogues et de développer de nouvelles compétences. Pour les utilisateurs, il s'agit d'avoir un accès simple aux informations associées aux ressources pour sélectionner celles qui correspondent à leurs besoins.

L'investissement financier et humain pour le développement et la maintenance d'un logiciel ou d'un Système d'information (SI) a décidé beaucoup de Centre de ressources Biologiques (CRB) à fonctionner avec des solutions « clefs en main ». Certaines de ces solutions sont soit développées au niveau des instituts publics, soit issues d'approches collaboratives et communautaires ; elles peuvent donc être libres de droit et d'utilisation. D'autres offres sont issues du secteur privé et souvent commerciales. (Liste non exhaustive en annexe)

Une réflexion a donc été engagée dans les CRB pour identifier les outils informatiques qui permettront d'afficher, d'explorer et d'exploiter de manière optimale ces informations, et de renforcer l'attractivité des collections. Parmi ces solutions : BioMICS, objet du présent article.

Au niveau européen, BioMICS a été choisi comme système d'information pour l'infrastructure de recherche MIRRI (MIcrobial Ressources Research Infrastructure) qui fédère 14 CRB microbiens de 10 pays de l'UE (dont la France, représentée par INRAE-CIRM et l'Institut Pasteur). Actuellement près de 200 000 souches sont enregistrées et accessibles (500 000 à terme - https://catalog.mirri.org/page/Strains_catalog_query).

Dans le contexte de RARE, cette solution a aussi été choisie depuis 2020 par le CRB Egg Parasitoids Collection (CRB EP-Coll) [<https://www6.inrae.fr/crb-eggparasitoids-coll/>], et depuis 2010 par le CBGP (UMR Centre de Biologie pour la Gestion des Populations) pour gérer la Continental Arthropod Collection [<https://doi.org/10.15454/D6XAKL>].

Nous présentons ici le retour d'expérience sur l'utilisation de BioMICS par la Collection de souches au CIRM-Levures et la Collection d'Arthropodes continentaux du CBGP.

Présentation de BioMICS

BioMICS est une suite d'outils dont les deux principaux sont BioMICS.net et BioMICS.web. C'est un système de gestion de données biologiques utilisé par de nombreux acteurs dans les domaines de la biotechnologie, de l'industrie pharmaceutique, de l'alimentation, des services de santé publique, des institutions académiques, universités, collections et musées.

BioMICS est produit par la société BioAware dont le siège est basé en Belgique. Les interlocuteurs sont francophones et anglophones. C'est un « software as a service » (SaaS) ou logiciel en tant que service, c'est à dire qu'il est installé sur des serveurs distants plutôt que sur une machine utilisateur. L'accès au logiciel en version desktop est basé sur le protocole RDP (Remote Desktop Protocol). La licence est annuelle et pour une seule instance, mais la connexion peut être multi-utilisateurs. Selon le type de licence choisie, le client aura accès ou non au module de génération de sites web (BioMICS.Web)⁴. Les licences annuelles achetées sont flottantes, c'est à dire qu'elles peuvent être utilisées de n'importe quel ordinateur, mais une licence ne peut être utilisée par deux utilisateurs concomitamment.

Module BioMICS.net

L'interface utilisateur de BioMICS.net est « user-friendly » et inspirée de l'environnement Microsoft. Cette interface

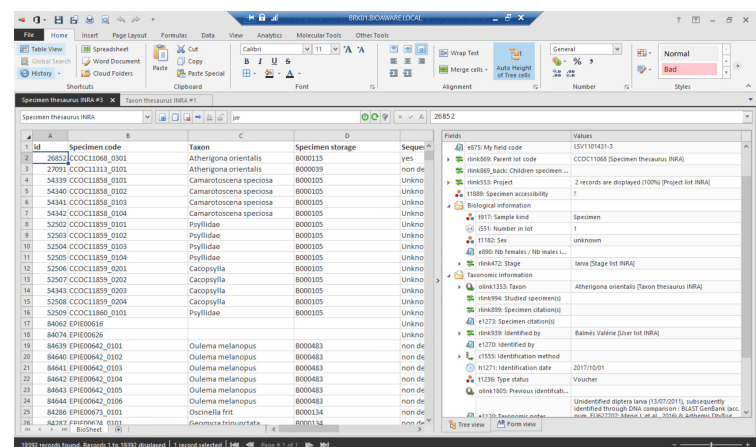


Figure 1. Capture d'écran de l'interface de BioMICS.net.

Credit : Collection d'Arthropodes Continentaux - CBGP

permet ainsi à toute personne, informaticienne ou non, de s'approprier le logiciel et de construire sa base de données. L'outil est ergonomique, flexible et modulable, et

4 BioAware SA NV. BioMICS Software pricing. <https://www.bio-aware.com/page/Pricing> [consulté le 11/08/2021]

peut être utilisé à différentes finalités (stockage, gestion, analyse) pour les ressources biologiques, les expériences de recherche ou les données biologiques de tous types (morphologie, physiologie, biochimie, chimie, chromatographie, électrophorèse, moléculaire, taxonomie, bibliographie, géographie, écologie, gestion du cycle de vie de l'échantillon,...).

Différents outils sont mis à disposition de l'utilisateur pour gérer et analyser les données de sa base, par exemple :

- Des outils moléculaires : enregistrement de modifications de séquences brutes, alignement par paire ou multiple de séquences, récupération automatique des profils de poids moléculaire des échantillons en utilisant l'analyse par électrophorèse sur gel.
- Pour une gestion de laboratoire encore plus intégrée, un module de système de gestion de l'information du laboratoire (LIMS) est aussi disponible ainsi qu'un outil de gestion de stockage des échantillons dans les congélateurs et autres dispositifs.
- Un outil d'analyse spectrale pour l'analyse Maldi-Tof.
- Un outil de visualisation par structuration hiérarchique des données permettant de déplacer les enregistrements en drag and drop (« cliquer et déplacer ») qui peut s'avérer utile lors de la gestion des révisions taxonomiques.
- Un outil de génération de graphiques comme sous Excel.
- Un outil de génération de distribution géographique sur carte des échantillons ayant des données GPS (style Google Earth).
- La création de tableaux de bord (« dashboard ») pour créer des affichages multiformats des données extraites (cartes, tableaux, camemberts, histogrammes, etc.). Ces tableaux de bord peuvent être publiés sur les sites web.

- L'automatisation de tâches répétitives via un module de scripts en C# et VB.

Module BioloMICS.web

BioAware enrichit son offre avec BioloMICS.web qui permet le déploiement d'une interface web à partir de la base de données. Cette fonctionnalité permet de sélectionner et de rendre disponible en ligne les ressources souhaitées d'une manière sécurisée et à jour.

BioloMICS.web permet la diffusion des données contenues dans BioloMICS.net avec une interface en WYSIWYG (What You See Is What You Get). Quelques notions en langage HTML pour la création des pages d'information textuelle peuvent tout de même être utiles. L'outil autorise (via l'application) le filtrage de données, l'extraction et le formatage d'une partie des données spécifiques à un projet, un groupe taxonomique ou tout autre filtre désiré par l'utilisateur. Il génère alors automatiquement une structure de site web dans laquelle des outils de recherche permettent d'accéder aux informations filtrées de la base de données.

Plusieurs sites web peuvent être générés à partir d'une même base de données.

Sécurité, stockage et hébergement des données

Pour les aspects sécurité des données, BioAware sous-traite des tests de pénétrations à EASI, une société experte en audit sécurité des infrastructures informatiques. Tous les serveurs sont protégés par la solution SentinelOne. Les serveurs sont sauvegardés intégralement tous les jours et les copies conservées une semaine. Tout le système est dupliqué pour garantir la disponibilité. Une version de sauvegarde est activable en 2 heures maximum en cas

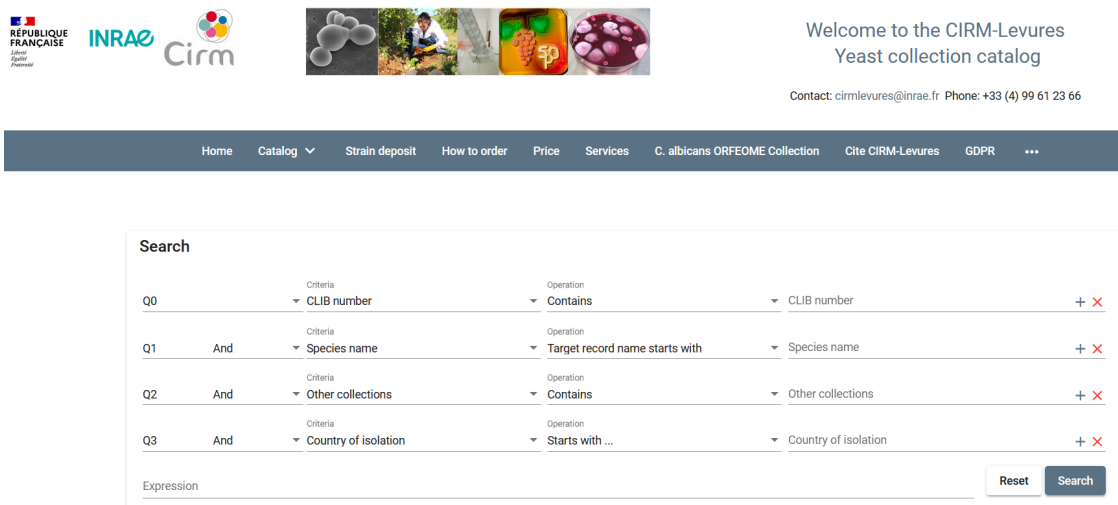


Figure 2. Capture d'écran de l'interface de BioloMICS.web (<https://cirm-levures.bio-aware.com/>)

d'effondrement du site principal (Site Recovery option) et également disponible via un autre datacenter. Une archive de chaque database client est créée journalièrement et sauvegardée sous format compressée (backup MySQL), pendant une période de 30 jours, sur les serveurs de BioAware. Cette archive est également déposée quotidiennement dans un service DropBox et mise à la disposition du client (les 5 versions les plus récentes sont gardées). Si le partenariat s'arrête, la société s'engage à restituer l'intégralité des données sous format ouvert (e.g. json/csv/Excel/MySQL/MongoDB) ou bien dans le format demandé pour exportation dans une autre base de données (avec schéma de l'architecture.)

Concernant l'hébergement des serveurs et donc des données, BioAware utilise les solutions Microsoft-Azure. La zone géographique de résidence est située en Europe (West Europe – Netherlands).

Pour les aspects d'administration, le système enregistre tous les changements dans un historique consultable. Toutes les actions, y compris celles entraînant des modifications de la structure de la base de données peuvent être annulées par les administrateurs ou l'opérateur. La restauration de la base à une date précise est possible en utilisant les sauvegardes disponibles. Le client peut demander à tout moment, ou à une fréquence souhaitée, une sauvegarde de la base de données.

Gestion des droits utilisateurs

L'accès par les utilisateurs à la base de données ou aux interfaces est géré par l'administrateur via un outil de gestion des utilisateurs. Cet outil permet de créer des groupes et d'affecter les droits (écriture, lecture, suppression) aux ressources sélectionnées (champ, table, type de données, champs et enregistrements).

Données à caractère personnel

BioAware garantit le respect du règlement général sur la protection des données (RGPD) concernant ses propres données clients. Pour ce qui est de la nature des données stockées dans le système par le client, cela n'engage que ce dernier, néanmoins le système propose une interface de gestion par le biais de deux rôles administrateurs (« Controller » et « Processor ».) Les fonctionnalités sont détaillées sur le site BioAware (<https://www.bio-aware.com/page/GDPR>).

Retours d'expérience des utilisateurs

Collection de souches au CIRM-Levures

Notre choix d'utiliser le logiciel BioloMICS pour notre base

de données regroupant les données associées aux souches de la collection du CIRM-Levures (2 600 souches) s'est fait, en 2016, après le départ de notre informaticien. Ce dernier, avait développé une base de données « maison » dont aucun autre informaticien de l'unité ne connaissait l'architecture, ce qui rendait difficile sa maintenance ; les soucis se sont donc accumulés jusqu'à rendre cette base non-incrémentable, en 2016. C'est ainsi que l'équipe du CIRM-Levures a décidé de passer par un prestataire pour créer une nouvelle base de données.

BioloMICS nous est apparu comme étant la meilleure solution ; en effet, il permet de créer une base donnée sur mesure et flexible, plusieurs formats de fichiers sont acceptés et il y a un historique permettant une traçabilité de tous les changements effectués et une gestion facile des droits d'accès aux différentes données, ce qui est primordial pour un CRB. Notre choix s'est porté sur BioloMICS aussi car le personnel du CIRM-Levures n'ayant pas les compétences requises, il fallait un logiciel utilisable par des non-informaticiens et de l'aide pour créer la nouvelle architecture de la base. D'autres points ont été importants dans choix. BioloMICS est le support choisi pour la version informatique de « The Yeast », la référence bibliographique pour la taxonomie des levures dans laquelle certaines données du CIRM-Levures seront intégrées. Et BioloMICS a aussi été choisi pour la base de données de la Microbial Resource Research Infrastructure (MIRRI) qui est une Infrastructure paneuropéenne pour la préservation, la recherche systématique, la fourniture et la valorisation des ressources microbiennes et de la biodiversité. Ainsi, avoir nos données dans BioloMICS facilite grandement le transfert vers ces deux bases de données.

Après une formation en plusieurs étapes pour faciliter notre apprentissage, l'équipe de BioAware nous a aidés en nous fournissant l'architecture de la base de données de « The Yeast ». Nous avons été accompagnés dans le large choix des types de champs que nous voulions créer et dans le transfert des données extraites de notre ancienne base dans la nouvelle. Au CIRM-Levures, deux groupes d'utilisateurs ont été créés : ceux ayant les droits de modifier la base de données et ceux qui ont juste un droit de consultation des données. Cela permet de limiter les erreurs possibles. Nous avons choisi de rentrer directement nos données dans la base sans passer par des fichiers d'importation.

Une fois l'ensemble des données transférées, nous avons pu passer au chantier du site internet associé à notre base de données. Ce dernier servant de catalogue en ligne permet aux clients de la collection de consulter les données associées aux souches que nous avons choisi de rendre

visibles (<https://cirm-levures.bio-aware.com/>). Pour cette nouvelle étape, nous avons aussi été accompagnés.

Dès que les étapes précédentes ont été terminées, nous avons pu facilement créer de nouveaux champs pour augmenter les données associées à nos souches consultables sur notre catalogue en ligne ou pour lier aux souches tous les documents les concernant pour une meilleure traçabilité ou pour s'adapter à de nouvelles réglementations comme celles liées au Protocole de Nagoya. En changeant certains types de champs, nous avons aussi rendu notre catalogue plus pratique, fonctionnel et agréable visuellement (intégration d'une carte du lieu de collecte, liste des souches d'une même espèce, d'un même pays, lien vers les publications, les génomes disponibles, documents PDF téléchargeables concernant le Protocole de Nagoya, ...). En effet, la flexibilité de BioloMICS pour la création de tables et de champs permet de monter en compétence à son rythme et de faire évoluer selon nos souhaits la structure de notre base de données et les types de champs.

À la création de notre base de données, nous avons commencé avec une grande majorité de champs texte, faciles à remplir, mais qui entraînent plus facilement des erreurs et doublons dus à des fautes de frappe ou d'orthographe. Nous sommes donc actuellement en train de les remplacer pour limiter les erreurs et pouvoir modifier rapidement une information utilisée plusieurs fois dans la base de données. Nous avons également établi des liens avec d'autres bases de données comme MycoBank, qui est pour les champignons la base de données taxonomiques de référence. Ce lien permet à nos enregistrements taxonomiques d'être automatiquement mis à jour lorsque la taxonomie des espèces est modifiée dans MycoBank. Nous avons aussi créé une table Bibliographie qui permet de relier les articles scientifiques à nos souches avec un lien vers la base de données PubMed ou vers d'autres journaux. Chaque lien créé vers une autre base de données est aussi affiché sur notre catalogue en ligne pour un accès rapide aux données taxonomiques et aux articles scientifiques pour nos clients. Nous avons aussi commencé la création d'un tableau de bord qui sera utilisé pour avoir une vision globale de notre collection. Ses sorties graphiques permettront d'illustrer notre site internet et la plaquette destinée à nos clients.

Collection d'Arthropodes Continentaux au CGBP

La Collection d'Arthropodes Continentaux (INRAE-CIRAD-Institut Agro-IRD), hébergée au CGBP, est constituée et utilisée en interne par des entomologistes comme outil

de diagnostic morphologique et génétique et comme témoin écologique et de la biodiversité. Au recrutement de la responsable technique du plateau « Collections » en 2010, les données étaient dispersées dans différents ordinateurs (sous Excel, FileMaker, Access) sans homogénéisation des données. Un de ses premiers objectifs était donc de trouver un système de gestion pour centraliser et structurer les informations sur les spécimens.

Intégrée en 2011 au programme européen FP7 Qbol sur les Organismes de quarantaine, la responsable a pu tester et prendre en main BioloMICS pour gérer les données taxonomiques, biologiques et génétiques des organismes de quarantaine européenne dont le CGBP était un des principaux acteurs en liaison avec l'Unité de recherche de Zoologie Forestières d'Orléans et le NVWA⁵ des Pays Bas pour les Arthropodes. Depuis, cette base a été déployée pour gérer l'intégralité de la Collection d'Arthropodes Continentaux du CGBP car elle répondait à différentes attentes : i) gérer une importante collection inerte d'arthropodes (environ un million de spécimens), ii) gérer d'importantes données taxonomiques régulièrement révisées (environ 60 000 espèces appartenant à une dizaine d'ordres), iii) intégrer des séquences génétiques barcodes COI, ITS, CythB... et proposer un outil de blast, iv) rendre accessible les données à l'extérieur, v) travailler sur une structure facilement modulable et ergonomique, vi) bénéficier d'une équipe de développement du logiciel professionnelle, à l'écoute et disponible (temps de réponse entre 1 minute et 24 heures).

Nous fonctionnons à ce jour avec 2 licences Ultimate. Une des deux licences est partagée entre les différents utilisateurs via un système de réservation interne. La deuxième licence est réservée à la super-administratrice pour déboguer les problèmes et répondre rapidement à une demande d'amélioration. Le CRB prend à sa charge chaque année une licence, la deuxième étant liée à des crédits qu'il nous faut trouver tous les ans (appel d'offre, projets, etc.).

La structure de la base Arthropodes a largement évolué depuis sa mise en place en 2011, et s'articule autour de quatre tables principales : Specimen, Taxonomie, Stockage et Sequences (Figure 3). Des tables, champs sont ajoutés, supprimés, modifiés pour plus de pragmatisme et en fonction des besoins ; ces manipulations faites par la super-administratrice se révèlent être simples.

Depuis 2016, nous mettons à dispositions d'autres unités de recherche utilisant BioloMICS nos tables Botanic et Taxon Arthropods. Ainsi, ces tables, développées et mises

5 The Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority.

Arthropods Database structure in BioLMICS

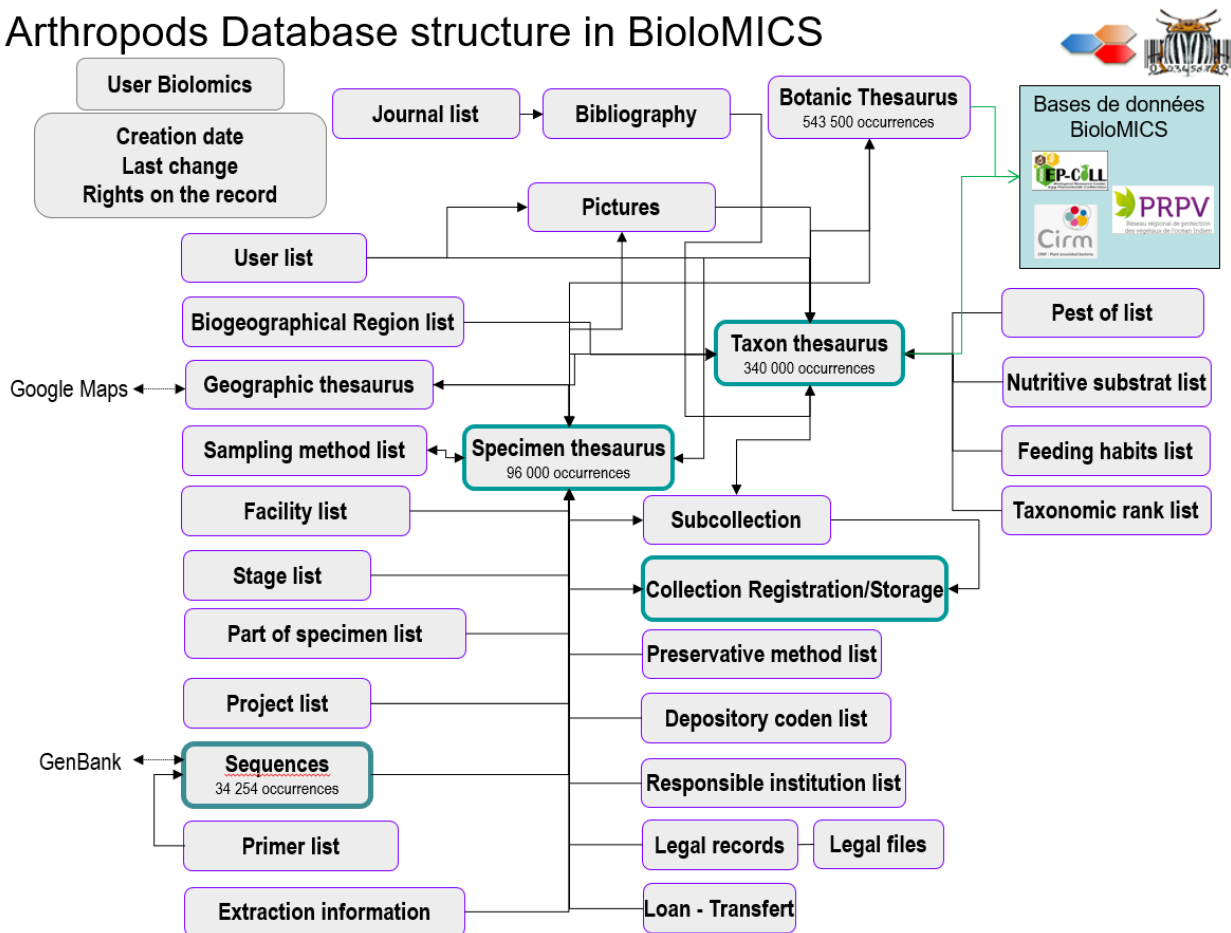


Figure 3. Structure de la base de données Arthropodes – CBGP : visualisation des tables et leurs liaisons.

à jour au CBGP, sont utilisées par la base PRPV du Pôle de la protection des plantes de La Réunion⁶, celles du CRB Ep-Coll⁷ et du CIRM-CFBP⁸ pour incrémenter leurs propres bases de données. Seuls les droits de lecture ont été pour l’instant accordés à ces unités, mais une collaboration plus poussée pourrait naître si des spécialistes de ces domaines voulaient coopérer.

L’équipe BioAware a répondu au fil des années à de nombreuses demandes d’amélioration de notre part comme la gestion en ontologie des enregistrements dont nous nous servons aujourd’hui pour gérer nos tables Taxon, Botanic, Collection Registration et Geography. Ainsi, nous pouvons par exemple par un simple glisser-déplacer d’une boîte d’échantillons sous une visualisation hiérarchique changer la localisation de tous les échantillons inclus.

Deux personnes sont référentes pour la base : une super-administratrice, chargée de la structuration et des droits, et un

administrateur, responsable des tables Taxonomie et Botanique ainsi que de l’intégration de données pour différents projets. Ces personnes sont les interlocuteurs privilégiés des utilisateurs internes et de l’équipe de BioAware en cas de problème ou de demande d’amélioration. Une dizaine de personnes (chercheurs et personnel technique) ont été formées en interne au CBGP et ont acquis différents droits en fonction de leur implication : lecture, ajout/modification/suppression des données, intégration en lot sur toutes ou certaines tables, administration de certaines tables, voire de certains champs, dans les tables. Les utilisateurs sont ainsi rattachés à des groupes dont les droits sont clairement définis.

Des « templates » (modèle de fichier) Excel standardisés, établis à destination des gestionnaires de collections et des porteurs de projets, permettent *in fine* l’importation en lots des données dans la base via un système de mapping (templates Specimen, Extraction, Sequences et Images).

6 Pôle de la protection des plantes, Saint Pierre de la Réunion. Réseau régional de protection des végétaux de l’océan Indien. <https://db.e-prpv.org/>.

7 Biological Resource Centre "Egg Parasitoids Collection - Ep-Coll" (<https://doi.org/10.15454/AY4LMT>). INRAE-Sophia-Antipolis.

8 CIRM-CFBP : Collection Française de Bactéries associées aux Plantes, INRAE, Angers-Beaucouzé.

BioLoMICS permettant de gérer facilement et finement les droits de diffusion, les porteurs de projets peuvent choisir de mettre leurs données sous embargo pour qu'elles soient en accès restreint jusqu'à la fin du projet de recherche. La sauvegarde des données de la base archivée pendant deux mois sur les serveurs de BioAware est doublée d'un back-up sql tous les 6 mois et d'une sauvegarde annuelle des données des tables en CSV sur les serveurs du CBGP.

Le module BioLoMICS.WEB nous permet de générer des sites internet ciblés ; ainsi si Arthemis DB@se⁹ rend accessible les données d'une grande diversité d'espèces d'arthropodes, notamment les ravageurs et les auxiliaires des cultures, PhylAphid DB@se¹⁰ est dédié aux données Pucerons. Sur ces sites, nous mettons à disposition du public des informations non confidentielles : données passeport de nos ressources, séquences validées d'ADN produites. Même si nous partageons les séquences barcodes validées sur Genbank, il est important pour le CBGP de gérer et de mettre à disposition un outil d'identification moléculaire spécialisé sur les arthropodes terrestres ne regroupant que des séquences validées par des experts en entomologie selon des procédures définies¹¹ afin d'éviter l'écueil de séquences incorrectement assignées à un groupe taxonomique, ou alors des séquences rattachées à un niveau taxonomique grossier. Ainsi, nous proposons à l'utilisateur d'utiliser l'outil de « BLAST » lui permettant de soumettre une séquence pour la comparer aux séquences de notre base et/ou de Genbank, d'afficher des arbres phylogénétiques sous différentes méthodes de reconstruction (UPGMA, WPGMA, Single linkage, Complete linkage, Neighbor joining, Ward, UPGMC, WPGMC) et d'avoir accès aux données du spécimen et de la séquence.

La possibilité que donne BioLoMICS de générer des sites WEB multiples, ciblés sur un projet ou un groupe taxonomique à partir d'une base de données unique, est un outil important de communication et de diffusion de l'information vers la communauté scientifique. Il nous permet de diffuser en temps réel les données de la base mais nécessite, là-aussi, un investissement en temps pour apprivoiser le module de création de site web.

Google Analytics fourni par BioAware nous permet de mesurer l'audience des sites web générés.

Synthèse des retours utilisateurs

En conclusion, pour nous, le système d'information dédié aux ressources biologiques BioLoMICS offre des services de qualité, car il est en constante évolution (de nombreuses options n'ont pas encore été testées faute de temps et d'un nombre de licence insuffisant). Ce système nous permet de gérer sereinement le cycle de vie de nos échantillons, de les référencer et de les valoriser grâce au module de création de sites web. Ce système ergonomique et facile d'utilisation pour des non-informaticiens nécessite toutefois l'implication de référents, en tant qu'administrateurs de la base et premiers interlocuteurs des utilisateurs, et de la société BioAware ; sans eux, la base de données ne pourrait être maintenue tant structurellement que pour l'implémentation des données. Un atout de ce produit réside aussi dans la réactivité du personnel de la société BioAware.

Intérêts de la solution

- Une gestion de la structuration de la base de données en WYSIWYG (What You See Is What You Get) complète et facile : possibilité d'ajout, de modification, de mise à jour ou de suppression de tables, champs, enregistrements, groupe d'utilisateurs et d'utilisateurs.
- Une gestion des droits des utilisateurs simple et à la carte : chaque utilisateur reçoit des droits de lecture, d'écriture et de suppression sur les tables, les champs et les enregistrements.
- Un historique des modifications permet à l'utilisateur ou à l'administrateur d'annuler des modifications en un clic.
- Un SAV disponible, compétent et un accompagnement pas à pas appréciable, notamment pour le développement des bases de données et des sites web.
- Une formation gratuite en français ou en anglais.
- Une aide en ligne en anglais régulièrement mise à jour.
- Des requêtes avancées avec des opérateurs booléens et logiques peuvent être effectuées, ce qui permet des recherches fines.
- La possibilité de créer ses propres vues sur des tables données. Cela permet de n'afficher que certains champs pour une meilleure visualisation de l'information.
- Une exportation et une importation sous des formats communs et standardisés : texte délimité, html, XML, MS-Excel ou MS-Word, Fasta, etc.

9 INRAE-CBGP, 2021, «Arthemis database», <https://doi.org/10.15454/TBGRIB>. [online database accessed 2021-08-09] : <https://arthemisdb.supagro.inra.fr/>.

10 Coeur d'acier et al., 2014. DNA barcoding and the Associated PhylAphidB@se Website for the identification of European Aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae). Plos One, 9 (6) to use the database in a publication. DOI:10.1371/journal.pone.0097620.

11 European and Mediterranean Plant Protection Organization [OEPP/EPPO], PM 7/129 (2) DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests 2021, Bulletin 51, 100-143, ISSN 0250-8052. DOI: 10.1111/epp.12724.

- L'importation de grandes quantités de données en une seule fois est possible.
- Les liens vers d'autres bases de données BioloMICS : une table peut être partagée par plusieurs comptes clients différents.
- Participation au développement de BioloMICS : les souhaits des clients sont pris en compte dans les futurs développements du système si le même souhait est remonté par plusieurs clients.

Points de vigilance

- Le coût annuel de la licence représente une somme importante pour certains laboratoires.
- Les requêtes ne peuvent se faire qu'entre tables liées directement. De ce fait, la structuration de la base relationnelle doit prendre en compte cette limite. De plus, il est complexe d'exporter directement le schéma d'une base de données relationnelle multi-tables dans un autre système.
- Un investissement d'une ou de plusieurs personne(s) du laboratoire est indispensable pour pouvoir concevoir, maintenir et développer les bases de données. Ces personnes ressources sont les interlocuteurs privilégiés avec BioAware.
- La sensibilisation et la formation des utilisateurs doivent être intégrées comme bonnes pratiques.
- La production et l'utilisation d'outils standardisés (e.g. fichier Excel formaté) est indispensable pour l'intégration de données venant de multiples sources.
- BioAware est une PME fondée et animée par un scientifique et l'évolution de la société à moyen terme est indéterminée.
- L'évolution des conditions d'accès sécurisés aux serveurs qui vont limiter la flexibilité d'utilisation par plusieurs utilisateurs au sein d'un CRB.

Conclusion

Nous avons vu que le logiciel BioloMICS est bien adapté à l'usage des CRB pour la gestion et la visibilité de leur catalogue. Néanmoins, et loin s'en faut, la majorité des collections d'intérêt agronomique ne sont pas maintenues dans un CRB, mais sont conservées dans les unités par les équipes de recherche. Les outils utilisés pour leur gestion n'offrent pas nécessairement toutes les garanties de traçabilité, de conformité réglementaire, d'intégrité des données et de pérennité qu'elles méritent. D'autre part, ces collections historiques ou de travail sont rarement exposées et pourraient être plus visibles, ce qui donnerait aux équipes qui les maintiennent un surcroît de reconnaissance et des opportunités de collaboration.

Ces quelques remarques finales, pour insister sur l'intérêt de mettre en place, à l'échelle de l'Institut, des départements et de DISC, une réflexion sur la gestion des collections qui pourrait se concrétiser par une liste d'outils de gestion des collections ayant l'agrément de l'Institut et dont la mise en œuvre permettrait d'obtenir un label collection-INRAE. Nous rappellerons pour finir que la nouvelle version du règlement intérieur des unités (ns2021-55b : <https://intranet.inra.fr/NS/ns2021-55.pdf>) indique, dans son article 16 Sauvegarde des collections, qu'il est de la mission des unités, des chercheurs, des centres et du CIRM de s'assurer de la conservation du patrimoine biologique de l'Institut. ■



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.

Annexe :

Liste non exhaustive d'outils et systèmes d'information

- **BioMICS** (<https://www.bio-aware.com/>) : Système d'information dédié à la gestion, l'analyse et la publication de données biologiques (description détaillée dans cet article.) Solution commerciale BioAware.
- **COLLEC-SCIENCE** (<https://www.collec-science.org/>) : Gestion des données d'échantillonnage et des stocks (mode Web). Écrit en PHP, il fonctionne avec une base de données PostgreSQL. Logiciel sous licence libre AGPL INRAE.
- **e-SIToul-Barcode** (<https://get.genotoul.fr/systeme-dinformation/#barcode>) : Système d'information dont le but est de permettre la traçabilité et la gestion d'objets par code barre (1D ou 2D). Outil développé et maintenu par INRAE depuis 2005. Cet outil fait partie de la suite logiciels du système d'information e-SIToul, développé par GeT-PlaGe et installé sur GeT-TQ et GeT-TRiX, permettant de mutualiser des ressources et les bases de données associées.
- **FREELIMS** (<https://freelims.org/>) : Système de gestion des informations de laboratoire (LIMS) basé sur le cloud pour la gestion des données de laboratoire. Solution gratuite sous conditions.
- **Gfi-eDataBiotec** (<https://www.inetum.com/fr/healthcare>) : Recensement, identifications, suivi, stockage de recherche pour les ressources des CRB et Cancéropôles. Société commerciale INETUM.
- **LABWARE** (<https://www.labware.com/>) : Systèmes de gestion de l'information de laboratoire et cahiers électroniques pour les laboratoires de Santé. Solution commerciale.
- **Livextens et TDHarmony** (<https://www.technidata-web.com/fr/>) : Informatique de laboratoire, suite de logiciels pour laboratoires d'analyses médicales, CRB et biobanques. Société commerciale Technidata.
- **MBioLIMS BioBanking** (<https://www.modul-bio.com/nos-solutions/mbiolims/>) : Gestion des échantillons et données associées. Logiciel commercial dédié aux CRB, biobanques, cohortes et aux sociétés de diagnostic. Société MODUL-BIO.
- **OLGA** (<http://crb-tropicaux.fr/>) : Application Web créée en 2012 permettant la gestion des données liées aux ressources génétiques végétales et aux collections des CRB. Solution portée par le CIRAD, INRAE et l'IRD.
- **SeedUSoon** (<https://www.cite-des-energies.fr/biam/seedusoon/>) : Logiciel pour la gestion de ressources biologiques (e.g. stocks de semences) et l'échange de lignées végétales. Licence gratuite CEA au bénéfice d'établissements de recherche et/ou d'enseignement à but non lucratif.
- **SPECIFY** (<https://www.specifysoftware.org/>) : Logiciel open-source pour le traitement des données associées aux spécimens dans les CRB. Il a été élaboré en partenariat avec des musées d'histoire naturelle.

Certains sites web proposent des listes ou des classements comparatifs des outils ou SI dédiés à la gestion des données génétiques de tous types :

- <https://www.biobanking.com/top-lims/>
- <https://www.g2.com/categories/lims>
- <https://blog.genofab.com/the-best-lims-software-in-2021>
- <https://digital.com/software-and-service-reviews/>
- <https://www.trustradius.com/laboratory-information-management>

Quelles perspectives pour RARe en Europe et dans le monde ?

Les articles rassemblés dans ce numéro montrent bien la large gamme de compétences qui caractérisent les ressources humaines de RARe dans le domaine des sciences de la vie comme dans celui des sciences de l'environnement, mais aussi sur le plan informatique, juridique et organisationnel. Cette richesse est assez unique dans le paysage des infrastructures de recherche, car elle implique tous les domaines du vivant et concerne des ressources renouvelables, à la différence des grandes collections de sciences naturelles hébergées par les Muséum d'Histoire Naturelle en France (membres de l'infrastructure nationale ReColNat) ou les Kew Gardens au Royaume-Uni. Ainsi, plusieurs articles traitent des méthodes permettant de régénérer des ressources ou de conserver leur potentiel reproductif, après leur conservation à long terme par congélation, afin de reconstituer une population ou produire des individus viables. Bien sûr, il existe encore de nombreux échantillons dispersés dans les laboratoires, qui gagneraient souvent à entrer en collection pour être plus accessibles à la recherche et mieux valorisés, sans parler d'un meilleur niveau de sécurisation et de traçabilité, notamment pour les échantillons anciens.

En Europe, les collections muséales sont regroupées dans l'infrastructure pour la recherche DISSCO (<https://www.dissco.eu>, présente sur la feuille de route ESFRI), mais l'équivalent, une infrastructure de recherche dédiée aux ressources agronomiques, n'existe pas. Un seul pays regroupe les ressources des animaux, plantes et forêts, il s'agit des Pays-Bas avec le Centre National de Ressources Génétiques (CGN) hébergé par l'université de Wageningen (<https://www.wur.nl>), mais les interactions entre domaines n'y semblent pas aussi actives que dans RARe. De plus, les réseaux européens de conservation des ressources génétiques pour l'agriculture et la forêt restent organisés sous l'égide de la FAO, et par domaine, avec le réseau ECPGR pour les plantes cultivées, ERFP pour les animaux et EUFORGEN pour les forêts. L'action concertée européenne GenResBridge (2019-2021) a justement réuni ces trois réseaux et a proposé une stratégie européenne intégrée pour les ressources génétiques¹, sans pour autant inclure les ressources issues de l'environnement comme le fait RARE, ni les ressources microbiennes, déjà rassemblées dans une infrastructure européenne MIRRI (<https://www.mirri.org/>, présente sur la feuille de route ESFRI). La stratégie européenne issue de GenResBridge concerne autant la conservation sur pied de populations vivantes que la constitution de banques de gènes, avec l'intérêt de les mettre en synergie. Actuellement, le domaine forestier privilégie la conservation de forêts plantées, le domaine végétal celui de la constitution de banques de gènes, et le domaine animal s'intéresse aux approches sur pied (*in vivo*) comme en banques (*in vitro*). Les travaux de GenResBridge ont montré des convergences intéressantes entre les domaines végétal et animal, que RARE peut contribuer à illustrer et à étendre aux autres domaines.

Au-delà de l'Europe, seule la Chine a mis en place une infrastructure de ressources biologiques, la China National Gene Bank (CNGB ; <http://www.cngb.org>) qui regroupe non seulement les cinq do-

¹ <http://www.genresbridge.eu/genetic-resources-strategy-for-europe/downloadable-version/>.

maines présents dans RARe, mais y ajoute les biobanques de la recherche médicale. Des contacts ont été pris en 2018, mais aucune visite ni séance de travail conjointe n'a encore pu être organisée, notamment en raison de la pandémie COVID-19. La CNGB comme RARe sont membres du Global Genome Biodiversity Network (GGBN ; <https://www.gbgn.org>) qui organise une conférence internationale tous les deux ans ; la prochaine est prévue au Mexique, en 2023, et la suivante aura lieu sur le site de la CNGB, en 2025. Le GGBN réunit également les collections muséales et représente la seule initiative mondiale dédiée à la diversité du vivant dans toutes ses dimensions, à l'exception de l'espèce humaine. La priorité du GGBN est d'alimenter un portail de données permettant de découvrir et de contacter toutes les collections de ses adhérents ; il s'agit en majorité de collections de spécimens de sciences naturelles (comme celle du CRB CoArCol de RARe), et RARe occupe une position originale dans le GGBN. Le Japon communique sur ses actions en faveur de la biodiversité (<https://www.nies.go.jp/biology/en/data.html>), mais seules les ressources microbiennes bénéficient d'un portail d'accès aux collections (<https://www.nite.go.jp/en/nbr/cultures/index.html>). Aux États-Unis, le département fédéral pour l'agriculture (USDA) a mis en place trois programmes de gestion des ressources génétiques pour les animaux, les plantes et les micro-organismes, mis en réseau par un portail d'accès commun (<https://www.ars-grin.gov/>). Au-delà de ce portail, les relations entre les trois domaines semblent se limiter à un service de duplication de stockage entre sites.

Le domaine des ressources génétiques végétales est le seul pour lequel existe un réseau international de conservation pour 35 collections d'espèces de plantes ou d'arbres cultivés, fédérées au sein du Consortium international CGIAR (<https://www.cgiar.org/the-genebank-platform/>).

On voit donc que RARe a une carte à jouer en Europe, et au niveau mondial avec le GGBN, pour proposer un concept d'infrastructure de recherche multi-domaines pour la gestion des ressources biologiques, en appui aux recherches en agronomie et environnement comme aux recherches en génomique et en biotechnologies, et développant des recherches propres en biologie de la conservation. L'infrastructure peut s'appuyer, pour cela, sur les compétences diversifiées de ses collaborateurs, telles qu'elles apparaissent dans ce numéro spécial.

Michèle Tixier-Boichard

Directrice de recherche, INRAE

What perspectives for AgroBRC/RARe in Europe and the world?

The articles gathered in this edition clearly show the wide ranges of skills characterising the human resources of AgroBRC/RARe in the fields of life sciences and the environmental sciences, as well as in computing, legal issues and organizational matters. This wealth is quite unique in the landscape of research infrastructures, as it involves all components of the living world and concerns renewable resources, contrary to the large natural science collections housed by Natural History Museum in France (member of the national infrastructure RecolNat) and Kew Gardens in the United Kingdom. Thus, several articles deal with methods designed to regenerate resources or conserve their reproductive potential, following their long-term conservation by freezing, in order to create a population or produce viable individuals. Naturally, there are still many samples dispersed in laboratories, that would be better off in a collection so as to be more accessible to research and better exploited, without speaking of better safeguarding and traceability for old samples.

In Europe, museum collections are grouped in the DISSCO research infrastructure (<https://www.dissco.eu>, present on the ESFRI roadmap), but the equivalent, a research infrastructure dedicated to agronomic resources does not exist. Only one country groups animal, plant and forest resources, the Netherlands with the National Genetic Resource Centre (CGN) hosted by the University of Wageningen (<https://www.wur.nl>). However, interactions between domains do not appear to be as active as in the AgroBRC. Moreover, European genetic resource conservation networks for agriculture and forestry remain organised under the aegis of the FAO and by domain with the ECPGR network for cultivated plants, ERFP for animals and EUFORGEN for forests. The concerted European project GenResBridge (2019-2021) has brought these three networks together and proposed an integrated European strategy for genetic resources¹, however without including resources originating from the environment as done by the AgroBRC, or microbial resources, already gathered in a European infrastructure MIRRI (<https://www.mirri.org/>, present on the ESFRI roadmap). The European strategy stemming from GenResBridge concerns the conservation of living planted populations as much as building gene banks, with the aim of generating synergy between them. At present, the forestry domain favours the conservation of planted forests, the plant domain that of building gene banks, and the animal domain that of combined approaches with living animals (in vivo) and banks (in vitro). The works of GenResBridge have shown interesting convergences between the animal and plant domains, that AgroBRC can contribute to illustrate and extend to other domains.

Apart from Europe, only China has set up a biological resource infrastructure, the China National Gene Bank (CNGB; <http://www.cngb.org>) which not only groups the five domains present in AgroBRC, but adds medical research biobanks. Contacts were made in 2018, but no visit or joint working session has yet been organised, due in particular to the COVID-19 pandemic. Both the CNGB and

¹ <http://www.genresbridge.eu/genetic-resources-strategy-for-europe/downloadable-version/>.

AgroBRC are members of the Global Genome Biodiversity Network (GGBN; <https://www.gbgn.org>) which organises an international conference every two years; the next one is due in Mexico in 2023, while the following one will be held at the site of the CNGB in 2025. The GGBN also groups museum collections and is the only initiative in the world dedicated to the diversity of every dimension of life, with the exception of human beings. The GGBN's priority is to fuel a portal of data making it possible to contact every collection and its members; for the most part they are collections of specimens from the natural sciences (like that of CRB CoArCol of AgroBRC), and AgroBRC stands on an original position in the GGBN. Japan communicates on its actions in favour of biodiversity (<https://www.nies.go.jp/biology/en/data.html>), but only microbial resources benefit from a collection access portal (<https://www.nite.go.jp/en/nbrc/cultures/index.html>). In the United States, the Federal Department of Agriculture (USDA) has set up three genetic resource management programs for animals, plants and microorganisms, organised as a network by a common access portal (<https://www.ars-grin.gov/>). In addition to this portal, relations between the three domains appear limited to a storage duplication service between sites.

The domain of plant genetic resources is the only one for which an international conservation network exists for 35 collections of plant and cultivated tree species, federated in the international consortium CGIAR (<https://www.cgiar.org/the-genebank-platform/>).

It can be seen that the AgroBRC infrastructure therefore has a card to play in Europe and at the global level with the GGBN, to offer a concept of multi-domain research infrastructure for managing biological resources to support agronomic and environmental research as well as research in genomics and biotechnology, and develop specific research in biology and conservation. To do this the infrastructure can rely on the diversified skills of its personnel, as they appear in this special edition.

Michèle Tixier-Boichard
Director of research, INRAE

Directeur de la publication :

Philippe Mauguin

Co-directeur de la publication :

Frédéric Gaymard

Rédacteur en chef :

Michel Verger

Comité éditorial :

**Jean-Eric Chauvin (Pilier Plantes), Roland Cottin (Chef de projet RARe),
Michel-Yves Mistou (Pilier Microbien), Christian Mougou (Pilier Environnement),
Michèle Tixier-Boichard (coordination RARe et Pilier Animal), Michel Verger (Pilier Forêt)**

Coordination éditoriale :

Houda Braham (Sciences Impact), Michel Verger (NOV'AE)

Illustration de couverture :

Patricia Huan

Maquette graphique :

Sabrina Benrabia Bordes

© INRAE, 2022 - e-ISSN 2823-3980 - <https://www.inrae.fr/novae>

Le comité éditorial remercie la DIPS0, le MESRI et l'Infrastructure de Recherche RARe pour le financement de ce numéro spécial, ainsi que tous les auteurs pour leur contribution et les reviewers pour leur relecture attentive.

INRAE

NOVAC

ingénierie & savoir-faire innovants