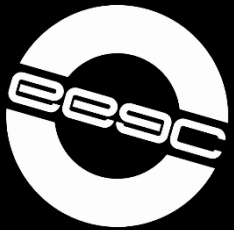


# Taxonomie moléculaire : Le BARCODING

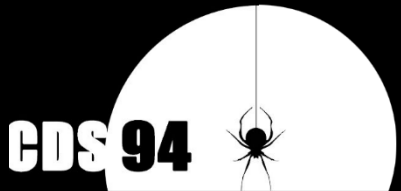
Stage biospéléo 16-17 octobre 2021

Marina FERRAND



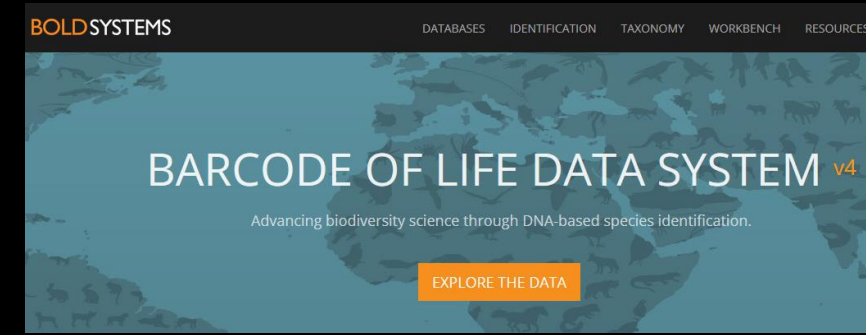
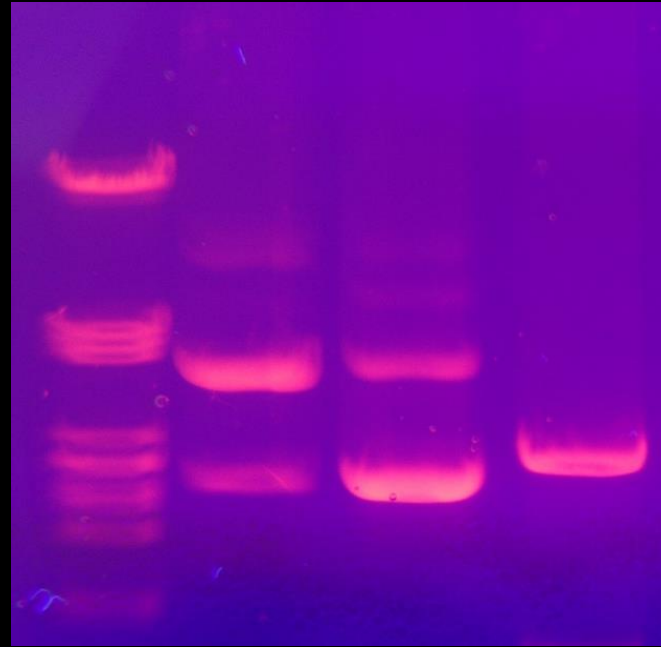
Fédération Française  
de Spéléologie

COMITE DEPARTEMENTAL  
DE SPELEOLOGIE.



**BI**  **CAF**

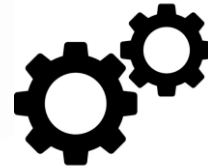
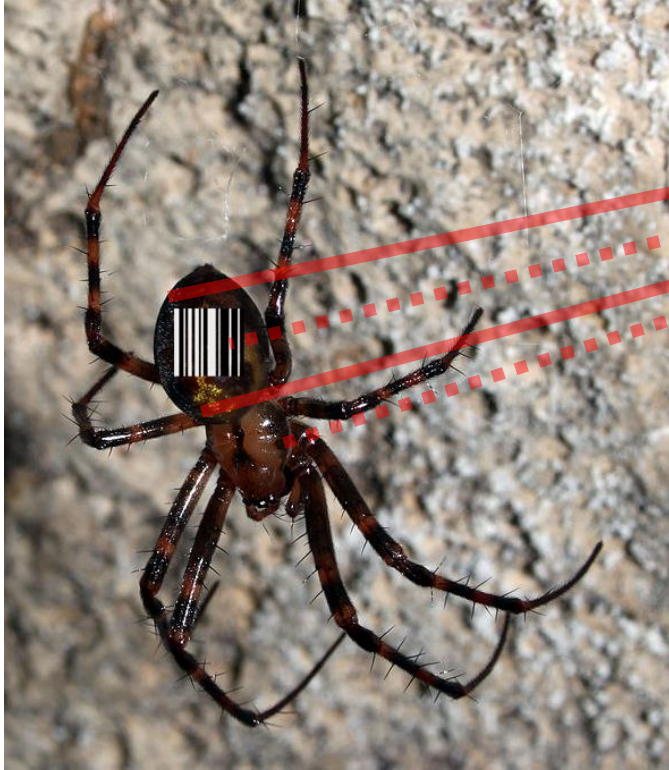
INVENTAIRE BIOSPELEOLOGIQUE DES  
CARRIERES SOUTERRAINES FRANCILIENNES



**STAGE**(s) **DECOUVERTE**  
de la faune cavernicole d'Ile-de-France



# Principe de Barcoding



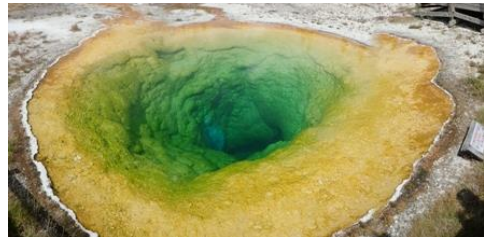
Analyser le code d'un specimen

Comparer avec une base de données de noms/code

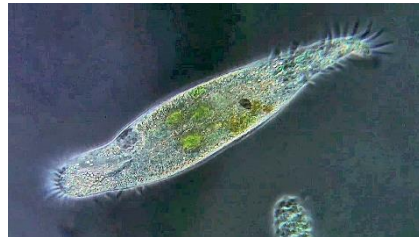
# Règnes du monde vivant



Bactéries



Archées



Protistes  
(ex : amibe, paramécie...)



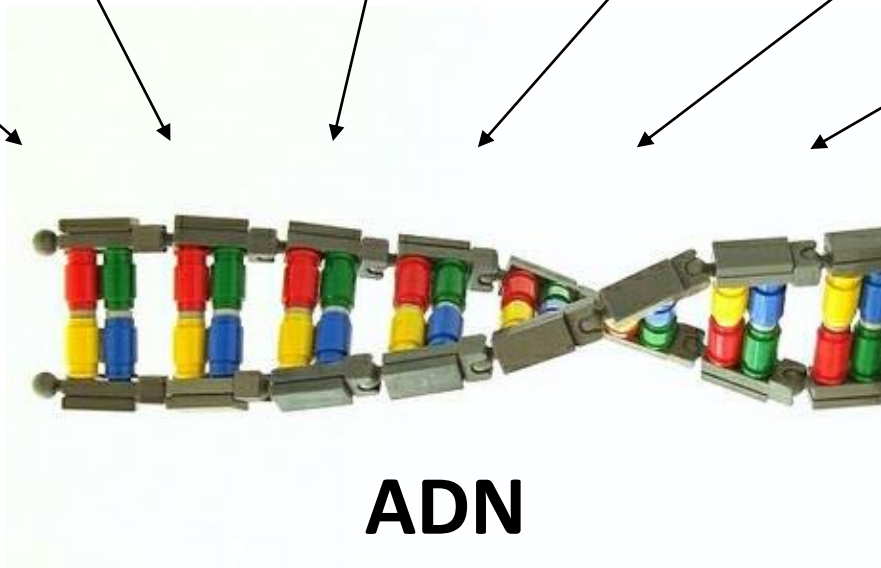
Plantes



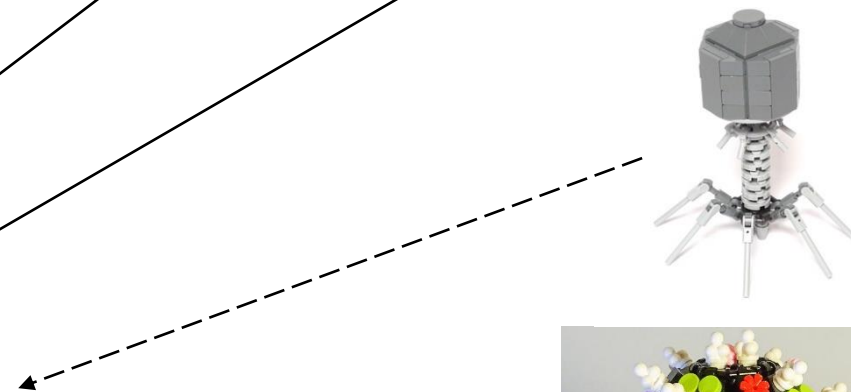
Champignons



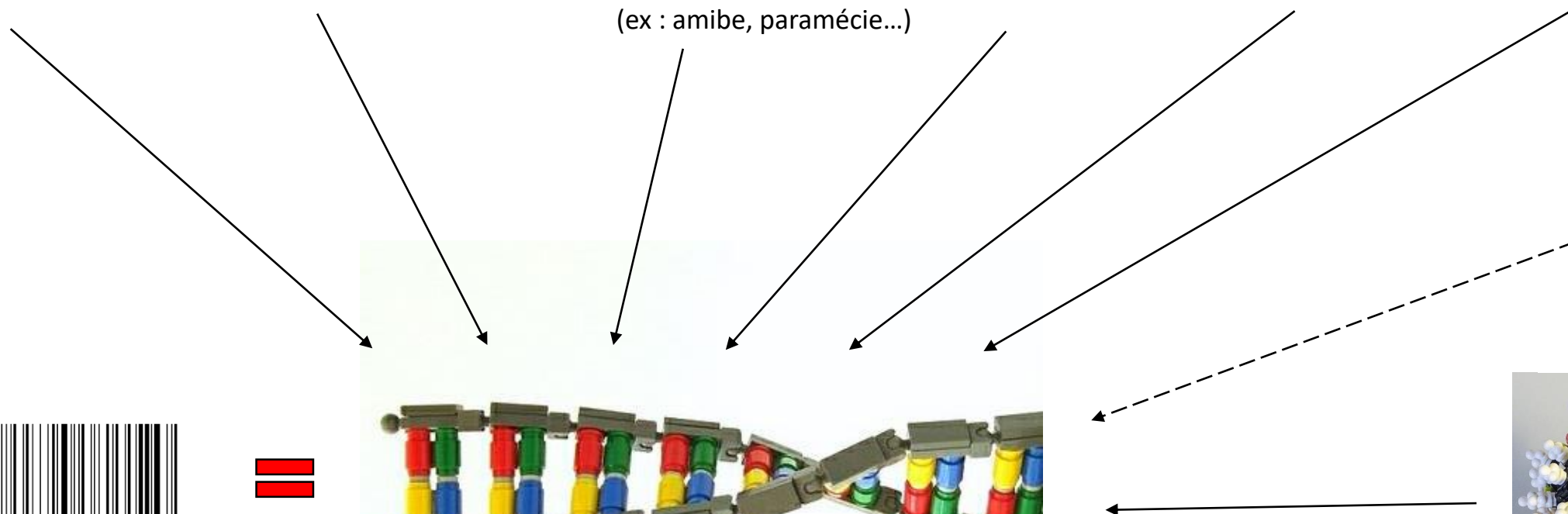
Animaux



**ADN**



Et les virus



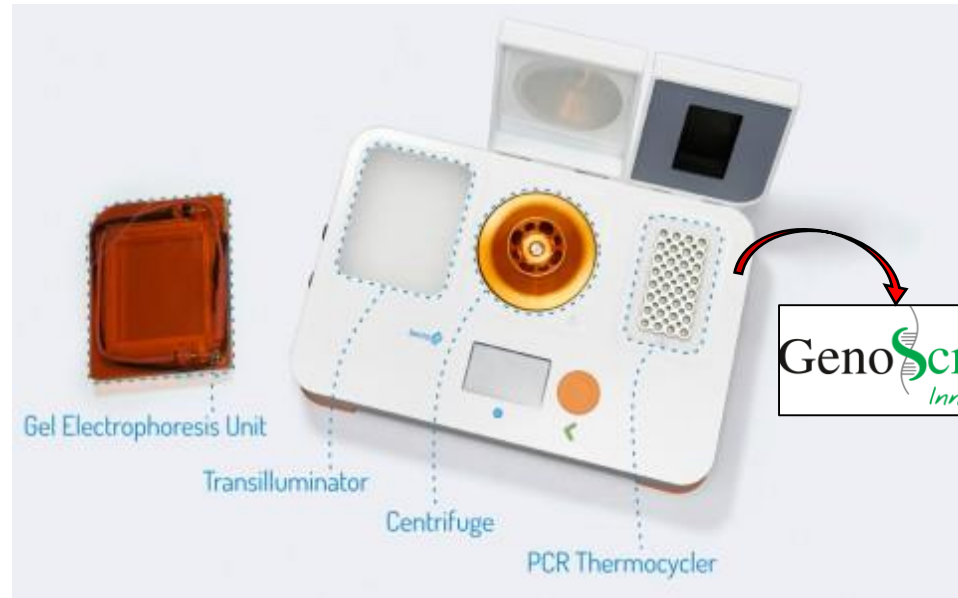
# En pratique...



Identification



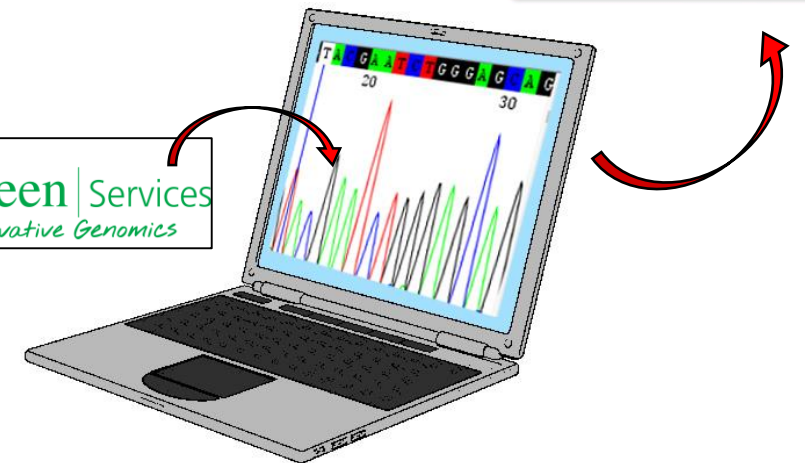
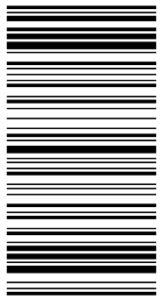
Amplification / Séquençage



Base de données



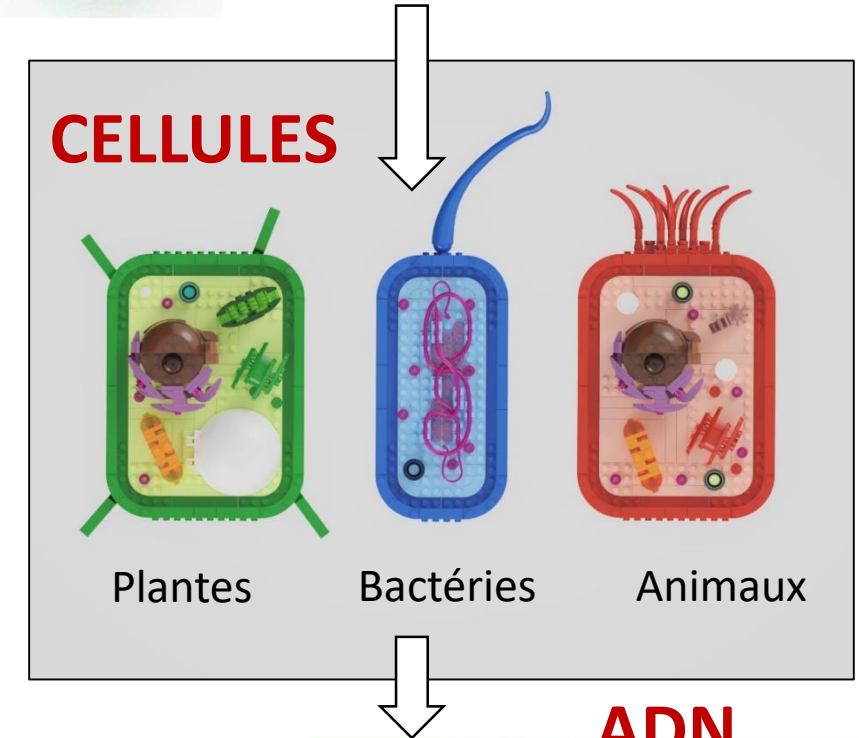
Code barre = séquence ADN



# Quelques notions théorique de biologie moléculaire

# Qu'est ce que l'ADN ?

- Une molécule appelée :  
Acide désoxyribonucléique
- Identique dans chaque cellule
- Contient l'information génétique (génome) :
  - Comment l'espèce se construit
  - Comment l'espèce fonctionne
  - Comment l'espèce se reproduit



Notice



# Biologie moléculaire : étudier l'ADN

1869 : Friedrich Miescher

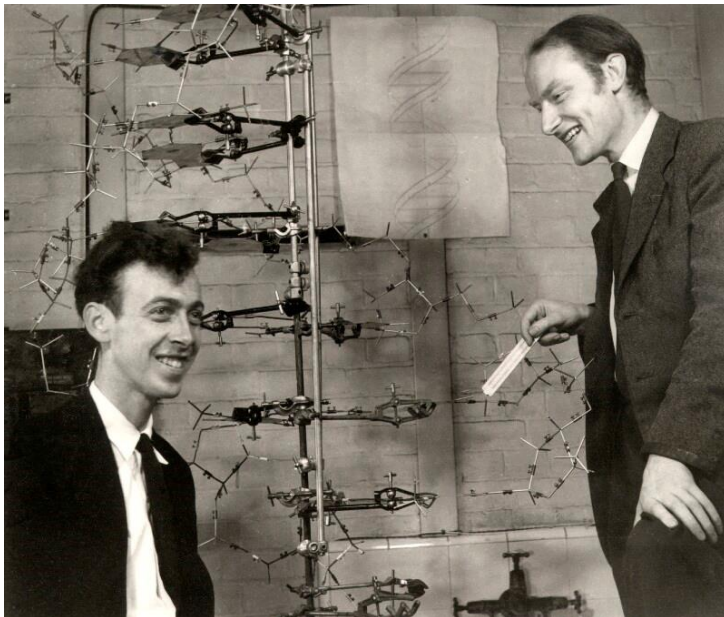
*Isolation molécule*

1944 : Avery, MacLeod et McCarty

*Vecteur de l'info génétique*

1953 : Watson and Crick

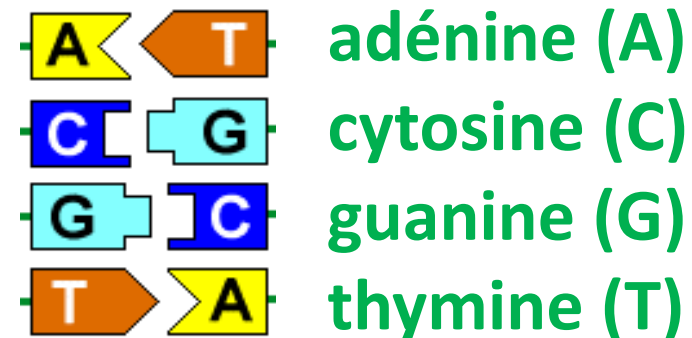
*Structure double hélice*



Structure : double hélice enroulé  
constitué de 2 brins antiparallèles

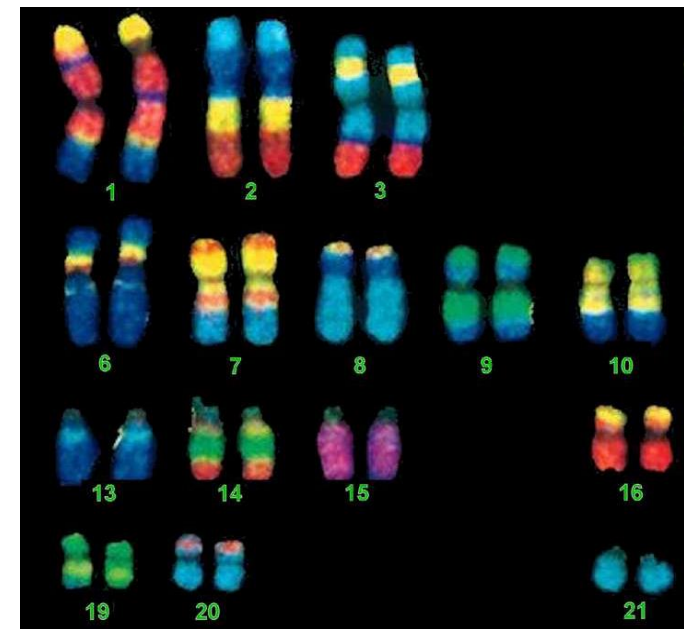
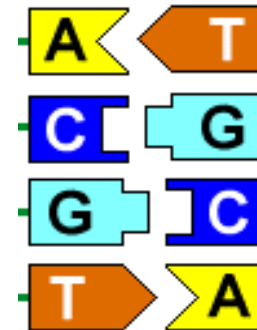
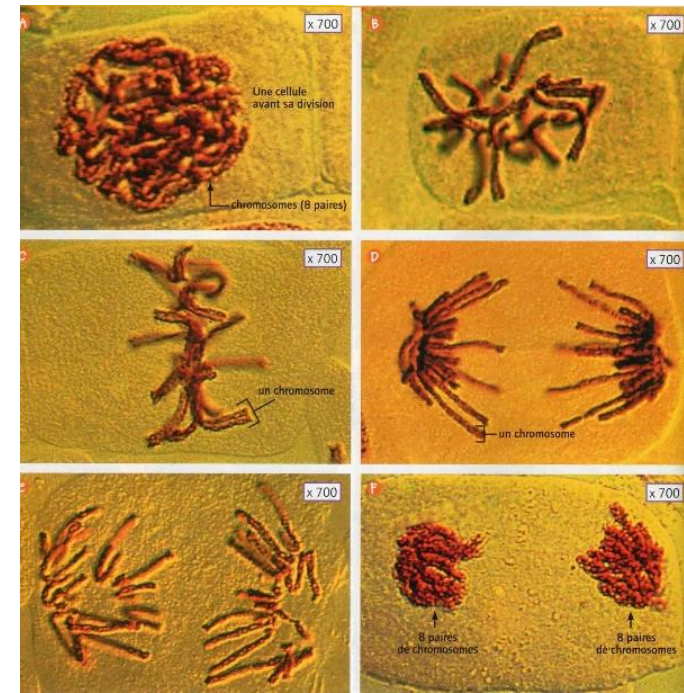
Structure Externe :  
phosphate et de sucres

Unité interne :  
**nucléotides** (base azotée),  
Assure la complémentarité des brins



# Chromosomes

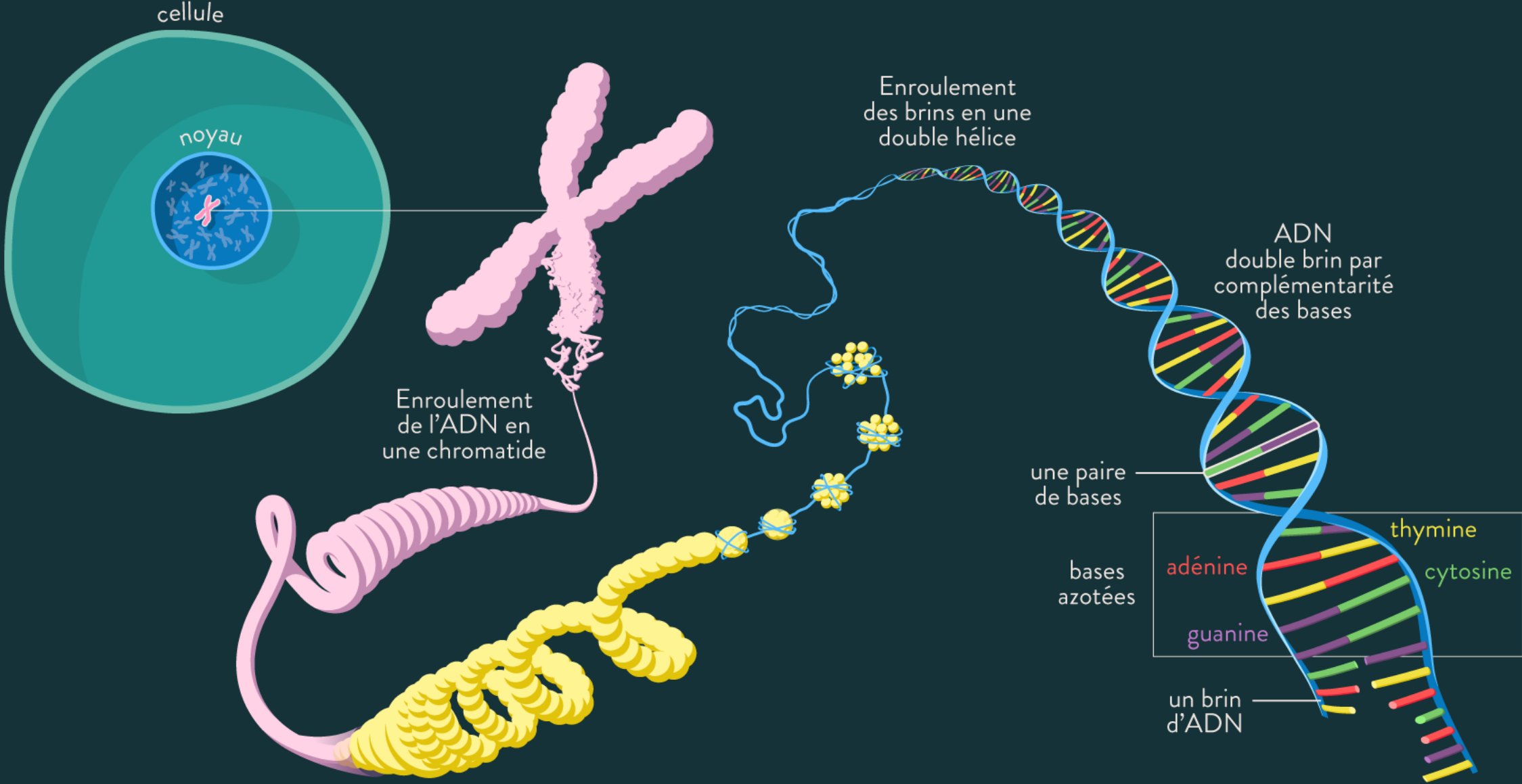
- Etat condensé de l'ADN lors des **divisions cellulaires**
- L'autre état décondensé s'appelle la chromatine
- Chaque espèce : Un nombre défini de chromosome
- Chaque chromosome a **un numéro**
  - Utilisé aussi lors de lecture des séquences
- La **position physique** :
  - Localisation sur un chromosome.
  - unité 'base pair' (bp)
  - Nombres de base depuis le début du chromosome
  - BASE = NUCLEOTIDE



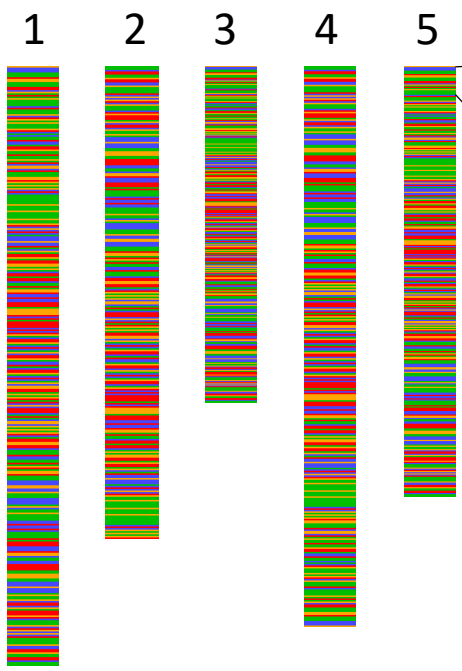


# Récapitulatif

## ADN et chromosomes



# Lire la séquence l'ADN



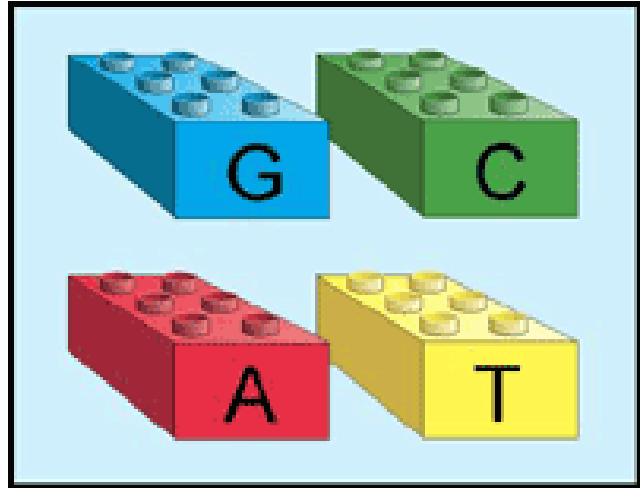
Chromosomes numérotés



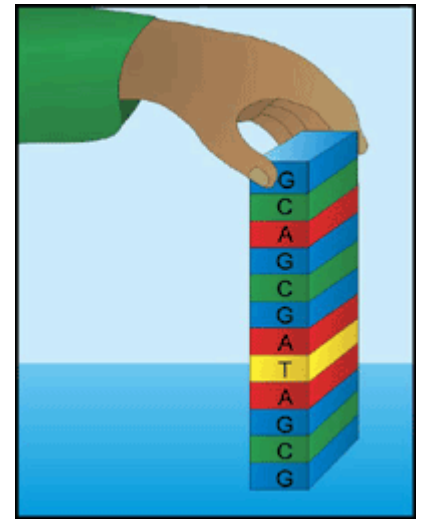
```
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGCAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGCATGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCAATTCTGACGTGCAAATCGATTGTTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA  
ATCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCGGA
```

Position physique

**Chr 5 : 1 – 1525**



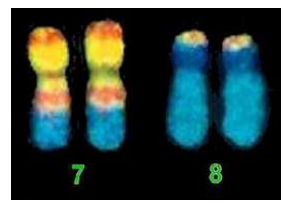
Nucléotides





# Quelles différences Entre les espèces ?

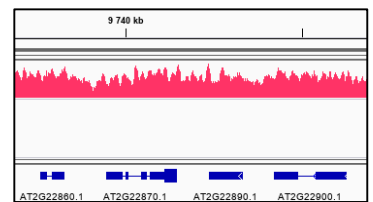
Nb de Chromosomes









Taille du génome







Nombre de gènes



*Génome complet connu*

Rat des villes		42	2,75 Millions paires bases	23 503 gènes
Humain		46	3,10	28 000
Blatte américaine		?	3,33	20 000
Moustique		6	0,289	14 000
Bactérie ( <i>Leptospira</i> sp.)		1	0,003	3 600
<i>Tomocerus minor</i>		12	0,332	

*Génome estimé*

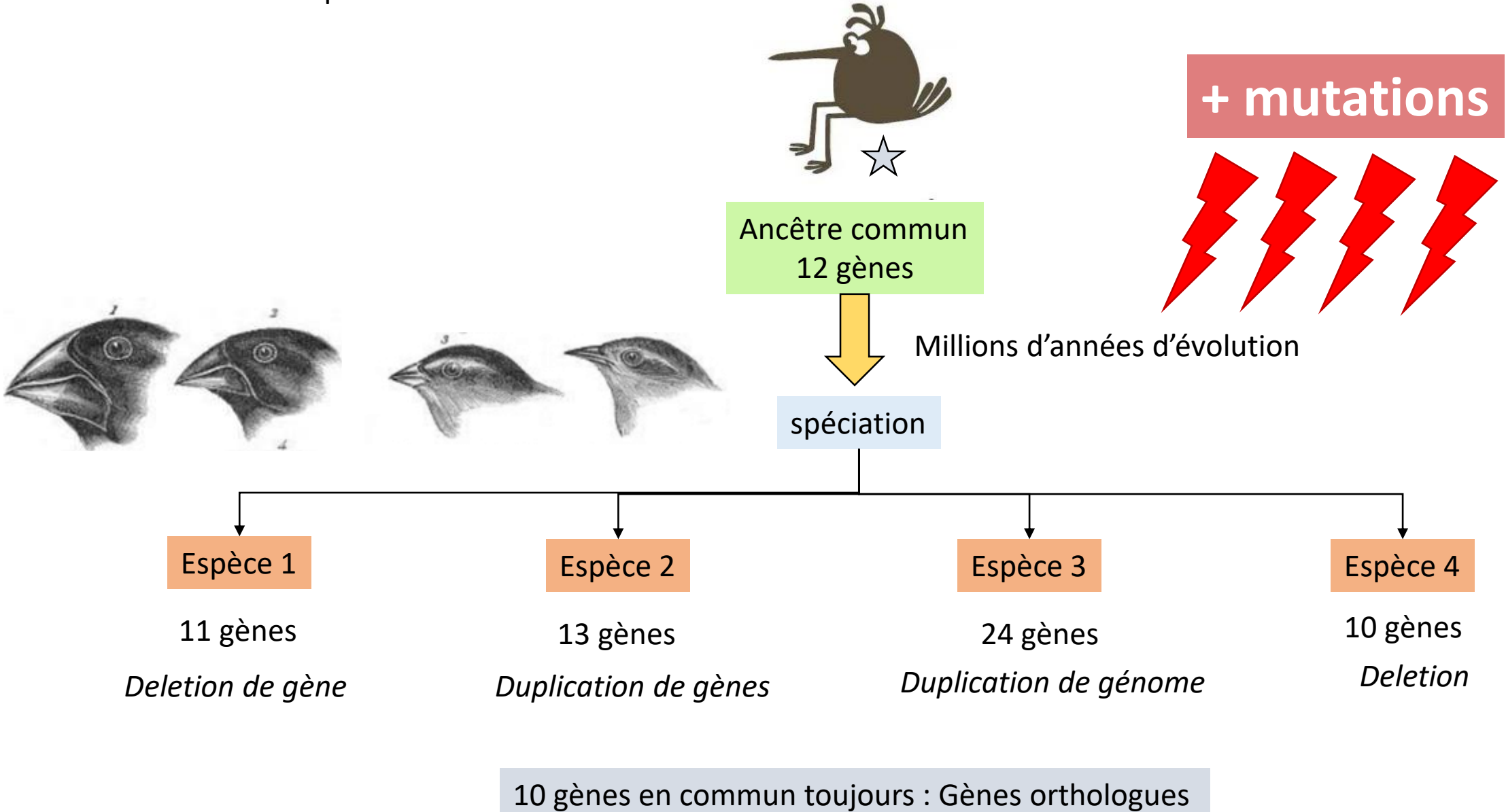
Ver de terre		36	?	
Acarien ( <i>Oribate</i> )		?	?	
Poisson rouge		100	0,15	
Chien		78	?	

# Point commun entre espèces ?



Le nombre de gènes n'est pas réaliste, c'est juste pour l'exemple

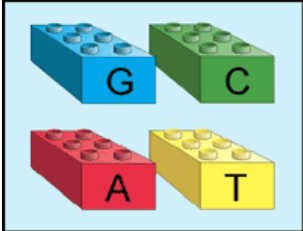
Évolution du vivant depuis 3 milliards d'années



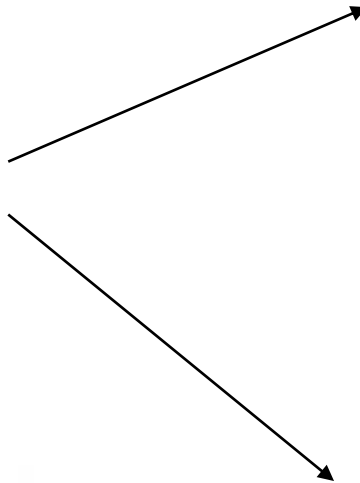
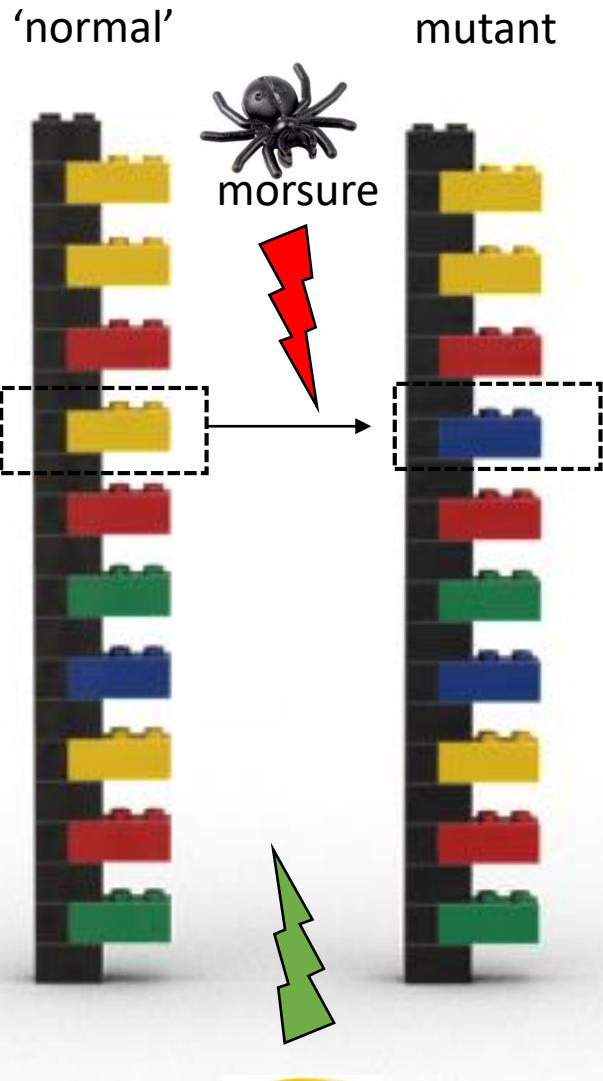
# Les mutations ?



AVANT



Nucléotides



spiderman

APRES



Toxic avanger

# Les mutations ?



- Ne donne pas de super-pouvoirs
- taux de mutation spontanée d'une espèce
  - Exemple : *Arabidopsis thaliana*
    - 1 ou 2 mutations par génération. (sur 157M bases)
- La plupart du temps : neutre (sans incidence visible)
- Avec l'accumulation de mutation : créé de la diversité dans le monde du vivant



# Gènes orthologues : accumulation de mutations ?

<i>Phaneroptera_falcat</i>	[	1	T	A	A	G	A	C	T	T	C	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	C	G	A
<i>Isophya_altaica_EF5</i>	[	1	T	A	A	G	C	T	T	A	C	T	A	A	T	C	C	G	G	G	C	C	G	A
<i>Bicolorana_bicolor_t</i>	[	1	T	T	A	G	T	T	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
<i>Roeseliana_roeseli</i>	[	1	T	C	A	G	T	C	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	A	G	A
<i>Montana_montana</i>	[	1	T	C	A	G	T	T	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
<i>Metrioptera_japonica</i>	[	1	T	T	A	G	T	C	T	A	C	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
<i>Gampsocleis_sedaki</i>	[	1	T	C	A	G	A	T	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
<i>Deracantha_deracar</i>	[	1	T	T	A	G	A	T	T	G	C	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	C	G	A
<i>Zychia_baranovi</i>	[	1	T	T	A	G	A	T	T	A	T	T	A	A	T	C	C	G	G	G	C	T	G	A
<i>Tettigonia_viridissim.</i>	[	1	T	A	A	G	T	C	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
<i>Conocephalus_disco</i>	[	1	T	T	A	G	C	T	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	T	G	C	T	G	A
<i>Conocephalus_sp.</i>	[	1	T	T	A	G	C	T	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
<i>Conocephalus_perce</i>	[	1	T	T	A	G	C	T	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	C	G	A
<i>Mecopoda_elongata_</i>	[	1	T	A	A	G	T	C	T	T	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
<i>Mecopoda_elongata_</i>	[	1	T	A	A	G	T	C	T	T	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
<i>Mecopoda_sp.__Mal.</i>	[	1	T	A	A	G	T	C	T	T	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
<i>Podisma_sapporens.</i>	[	1	T	A	A	G	A	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	G	A	A	C	A	G	A
<i>Hetrodes_pupus_EF3</i>	[	1	T	A	A	G	C	C	T	T	T	T	A	A	T	T	C	G	T	T	C	A	G	A

## • Mutations :

- modifications accidentelles de nucléotides (erreur de réplication)
- Certaines sont réparées.
- D'autres conservées
- D'autres transmises de génération en génération
- Accumulées : vont faire diverger des espèces. Mécanisme de l'Evolution.

## • Outils d'identification :

- pour discriminer les espèces.

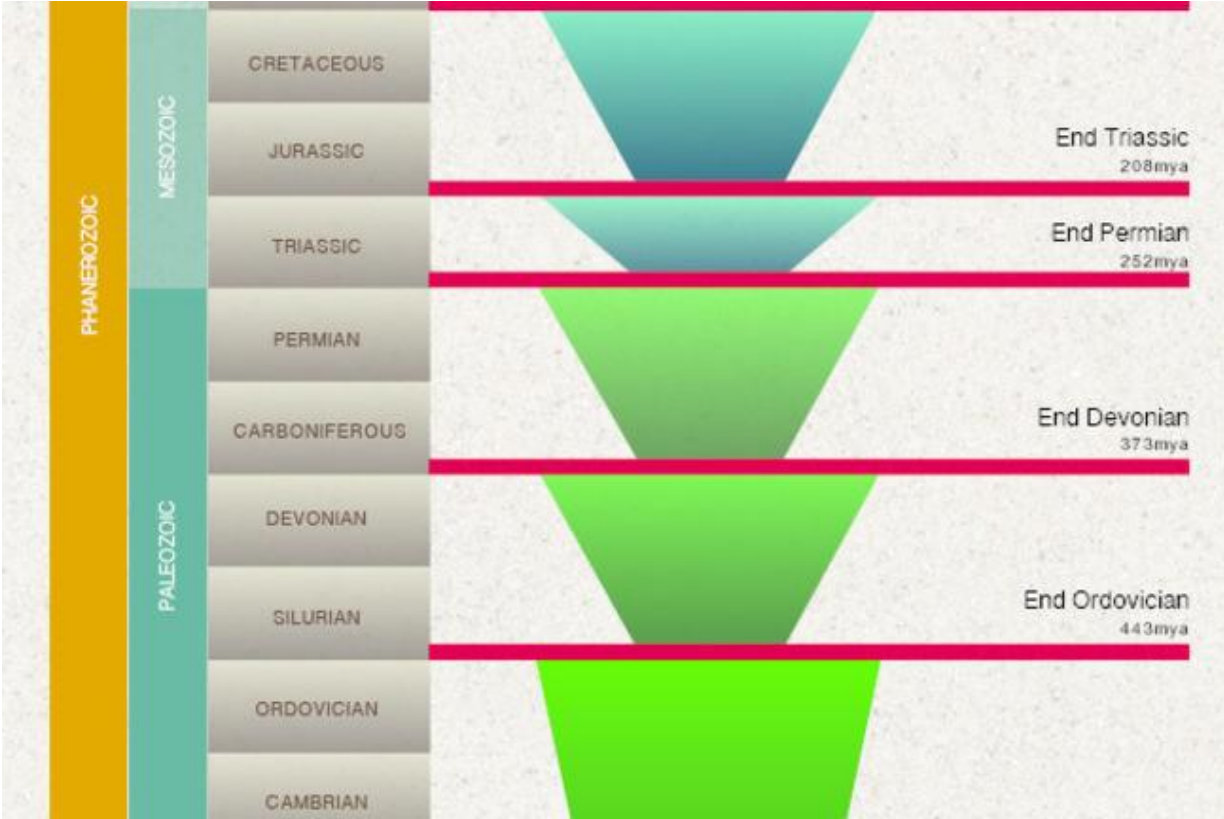
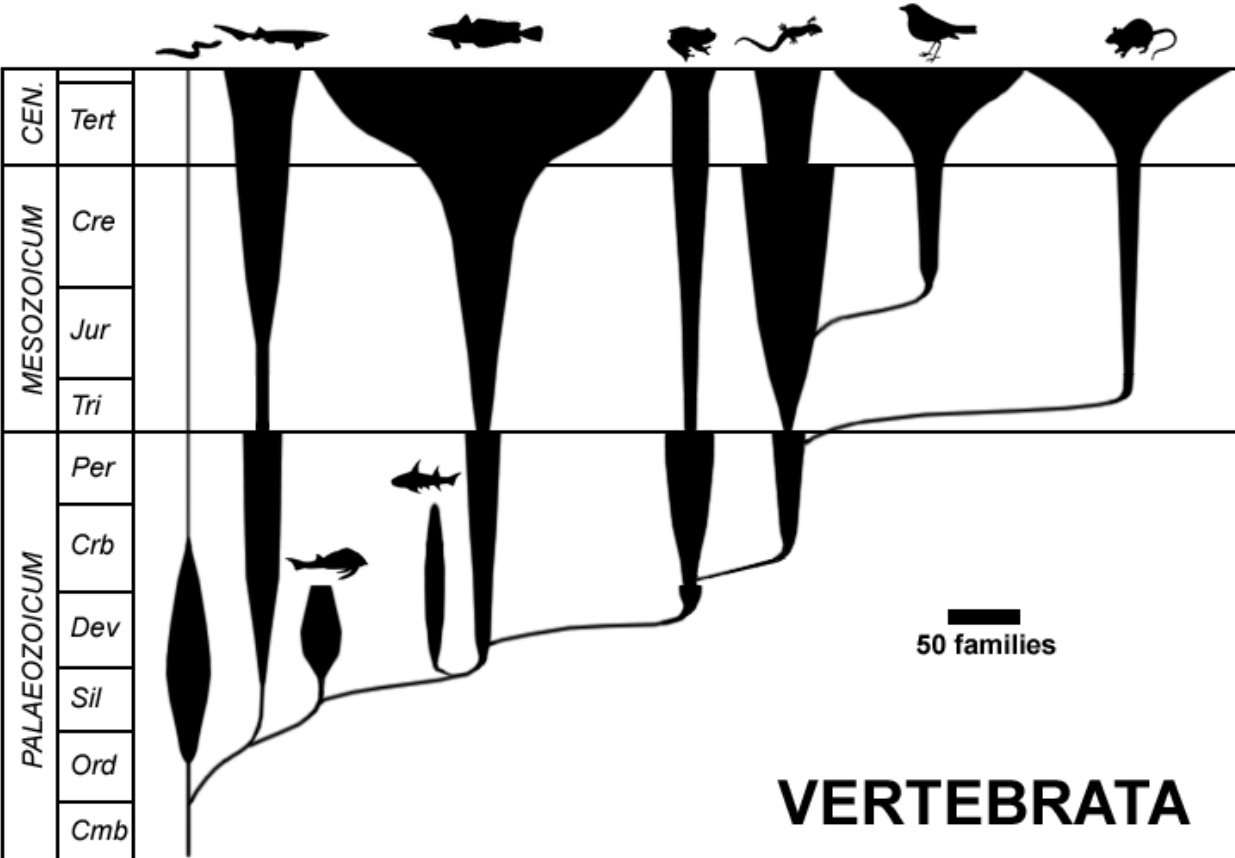


# Dynamisme de l'évolution

Radiation évolutive : spéciation  
 Disparitions d'espèces : extinction massive



- 65 Ma, l'extinction Crétacé-Tertiaire tue 50 % des espèces



Maintenant qu'on sait un peu plus sur l'ADN

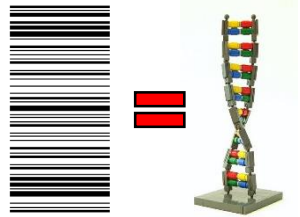
**Revenons au  
barcoding**

# DNA-Barcoding : de quoi on a besoin ?



+ Centrifugeuse

## extraction ADN



1984 : PCR par Kary Mullis

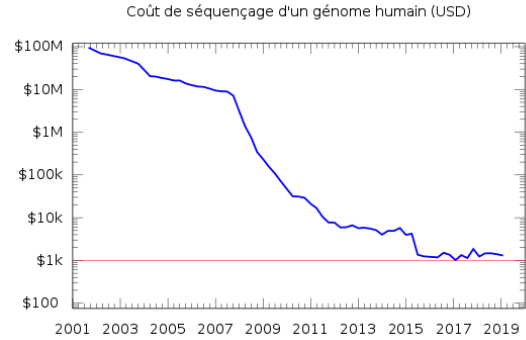


## Amplification de l'ADN

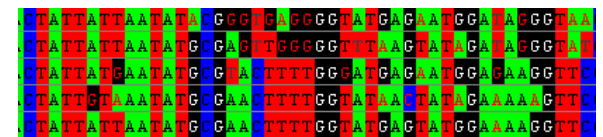
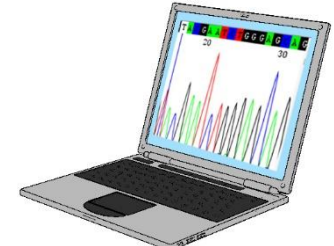


1977 : Séquençage Sanger

2003 : génome humain



## Séquençage



# DNA-Barcoding

## Concept Barcoding :

- [Paul Hebert et al. 2003](#)

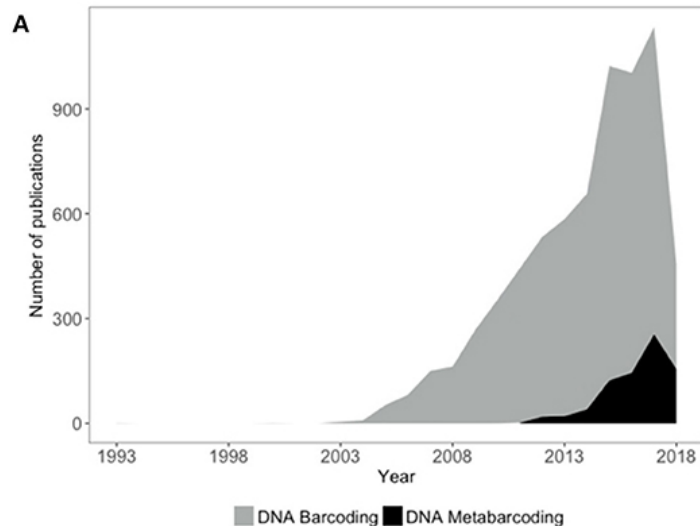
## 2010 : iBOL

(*International Barcode of Life*)

Grande bibliothèque de référence de séquences d'identification

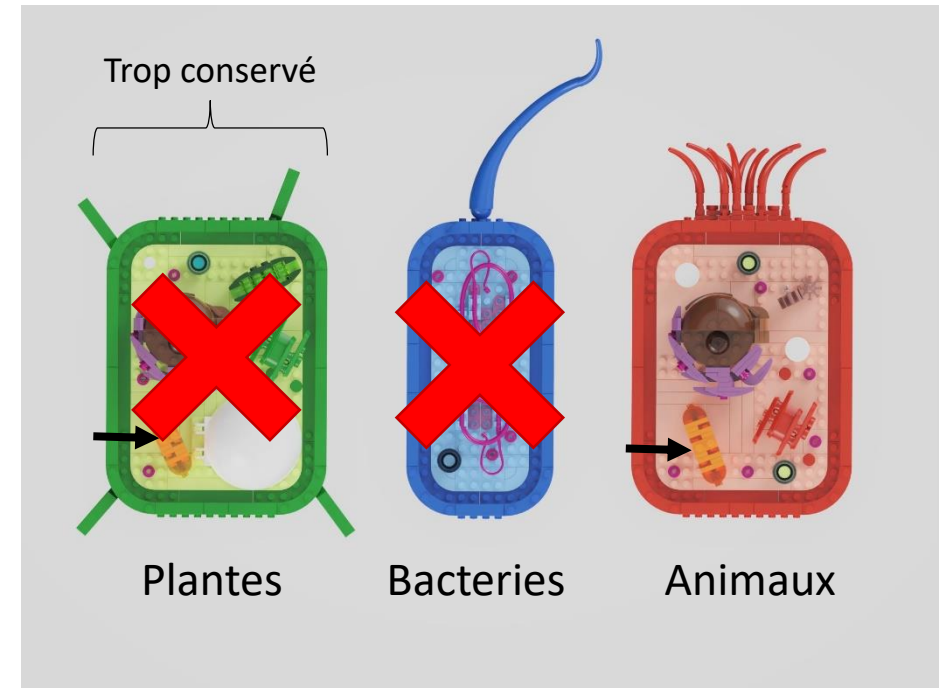


Base de données ?



## Gène cible : MARQUEUR MOLECULAIRE

- Gène conservé chez  $\neq$  espèces
- Assez discriminantes
- Exemple :
  - [Cytochrome-c-Oxydase](#) (CO1 ou COX1, 648bp)
  - protéine intervenant dans la chaîne respiratoire



# DNA-Barcoding : Avantages



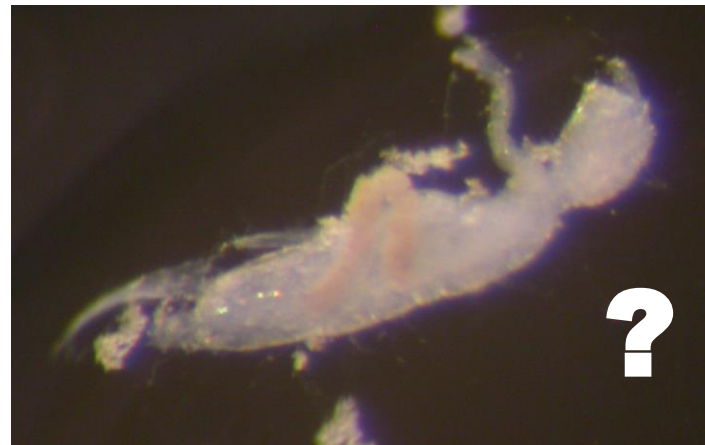
*Kryptonesticus eremita*  
Mâle



*Kryptonesticus eremita*  
femelle



*Juvénile*



*Echantillon abîmé*



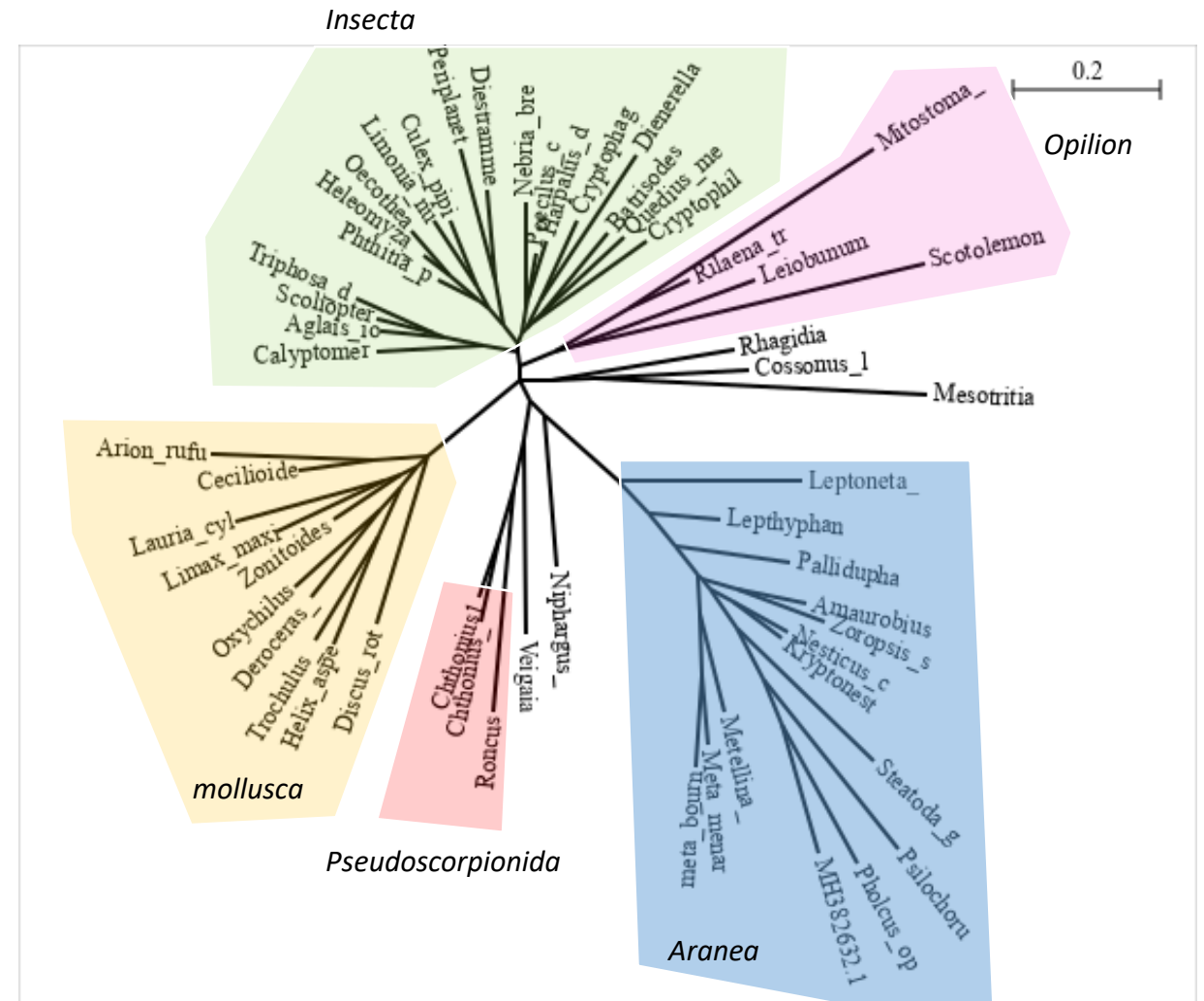
*Larve*

# Générer des arbres phylogénétiques

Evaluer rapidement la biodiversité  
Etudier la diversité génétique  
Hypothèse sur l'évolution

- Vérifier la pertinence du marqueur
  - choisi pour barcoding
- Longueurs branches :
  - distance génétique
- Intersection branches :
  - ancêtre commun
- Branches proches : moins de différence, plus proche parenté
  - Les espèce des mêmes classes plus proche

COI pour espèces observées dans les kta



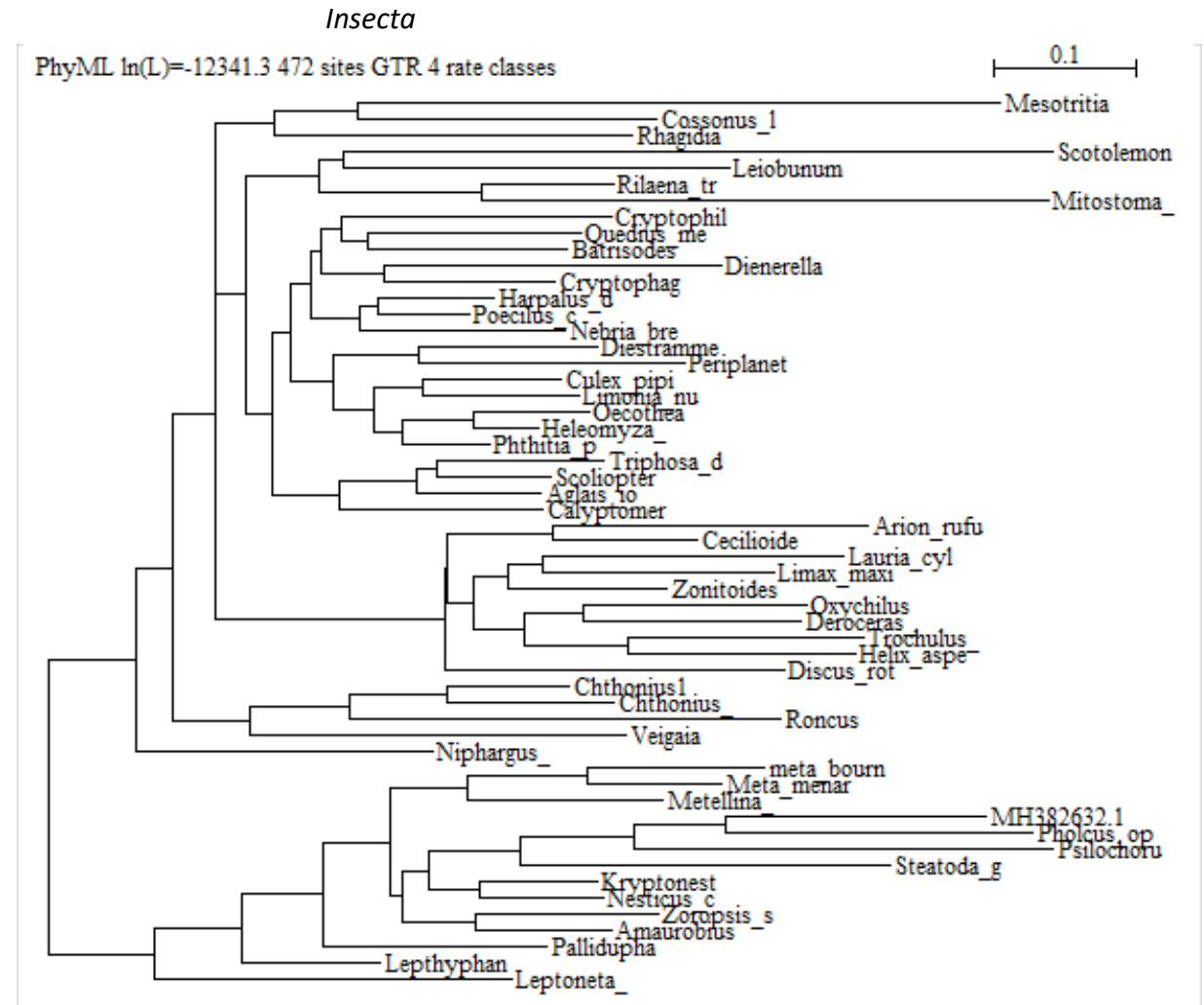
myPhyl tree on COI sequence from NCBI Nucleotids

# Générer des arbres phylogénétiques

Evaluer rapidement la biodiversité  
Etudier la diversité génétique  
Reconstitution de l'évolution

- Vérifier la pertinence du marqueur
  - choisi pour barcoding
- Longueurs branches :
  - distance génétique
- Intersection branches :
  - ancêtre commun
- Branches proches : moins de différence, plus proche parenté
  - Les espèce des mêmes classes plus proche

COI pour espèces observées dans les kta



myPhyl tree on COI sequence from NCBI Nucleotids

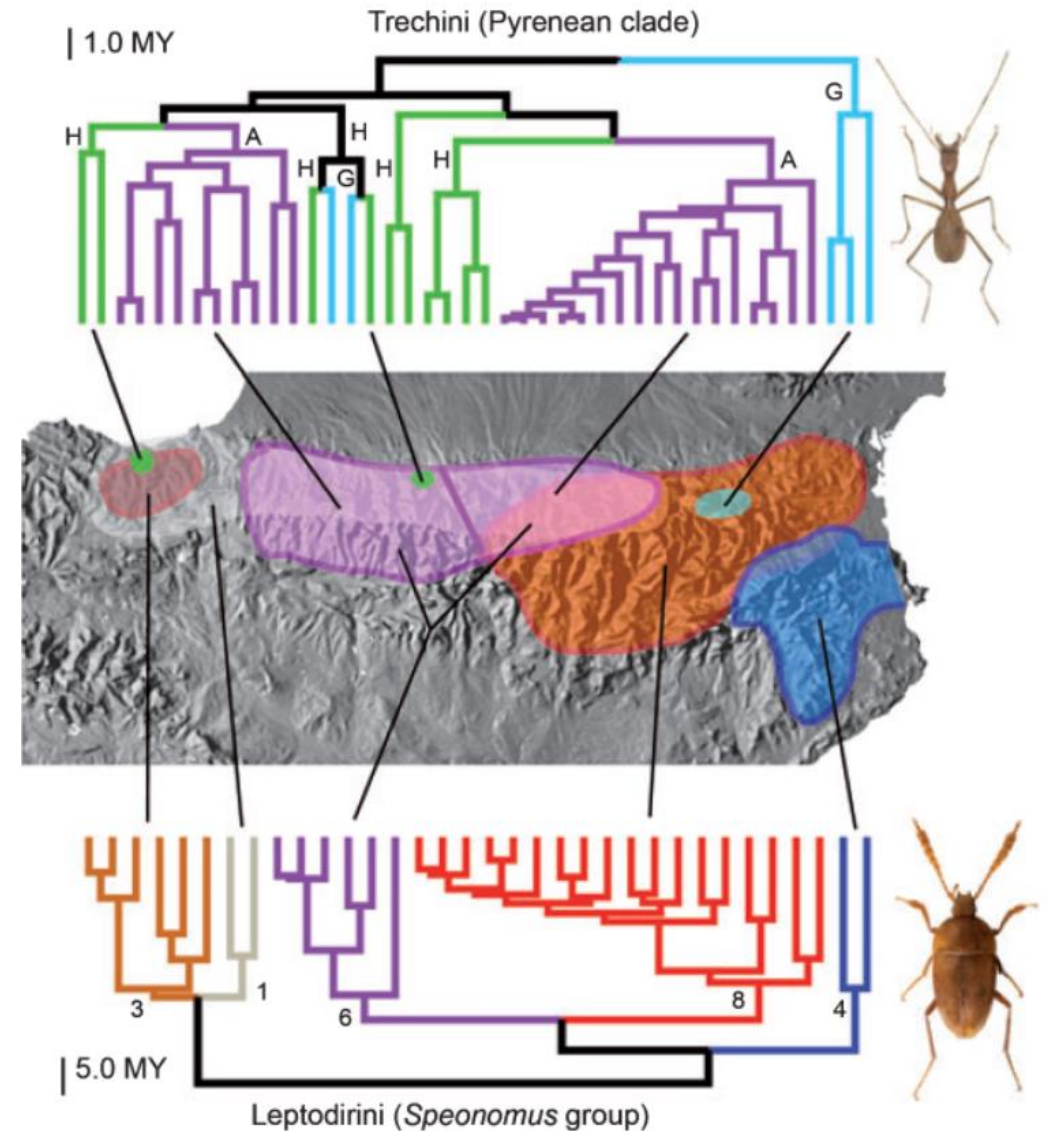
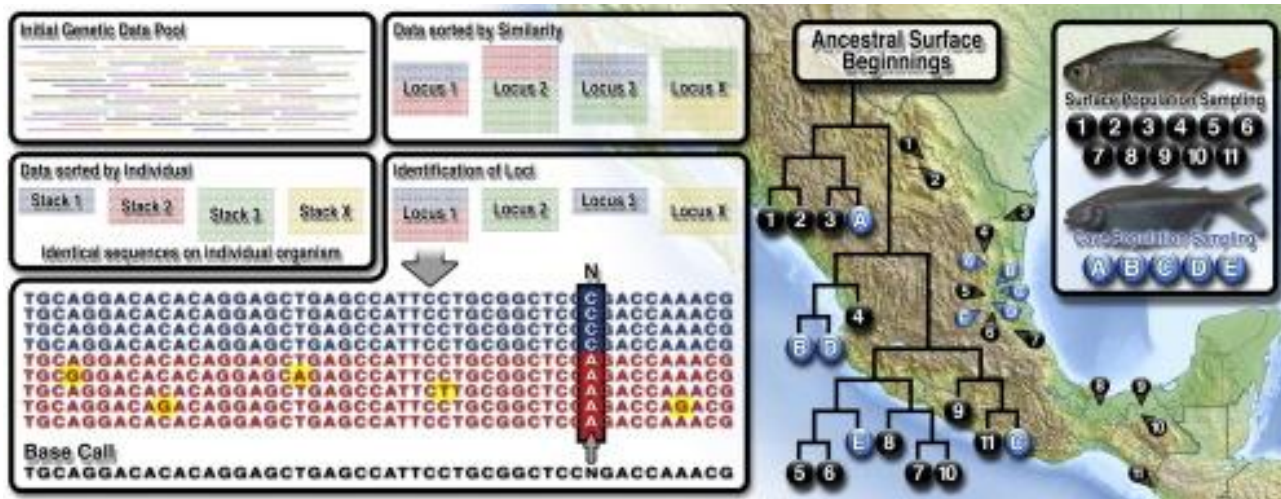
# Phylogéographie

Comparer répartition Cave / Surface

Entre plusieurs espèces.

Hypothèses sur évolution / origine du peuplement

Description microhabitat : isolation des espèces = spéciation



<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2017.0193>

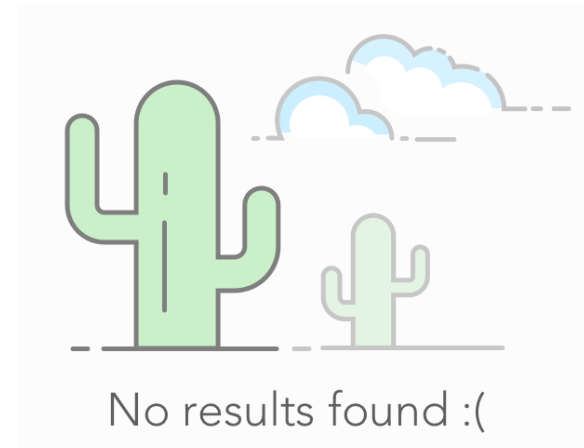
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ece3.4507>



# DNA-Barcoding : Inconvénients



- Nécessite une donnée de référence validée par un expert taxonomique.
- Parfois contradiction avec taxonomie classique (espèces cryptiques considérées comme 1 espèce qui en fait en est plusieurs)
- !! Erreurs publiées dans les bases de données
- Pas encore de gène de ref. efficace pour végétaux et mycètes



# Taxonomie intégrative

Délimiter les frontières entre les espèces

Une approche multidisciplinaire....

## Critères morphologiques

19(18). Dens dorsally crenulate and curving upward, basally in line with manubrium (fig.11a)..... 20  
Dens straight and usually forming an obtuse basal angle with manubrium (fig.11b), usually not crenulate..... Paronellidae

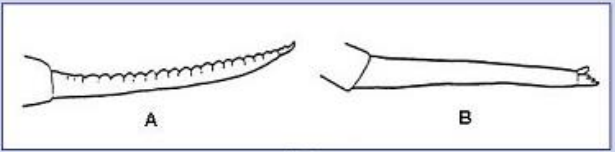
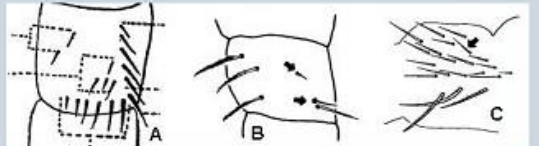


Fig.11.

20(19). Antennae five or six segmented..... Entomobryidae 7  
Antennae four segmented..... 21

21(20). Third abdominal segment clearly shorter than fourth..... 22  
Third abdominal segment longer to slightly shorter than fourth..... 24

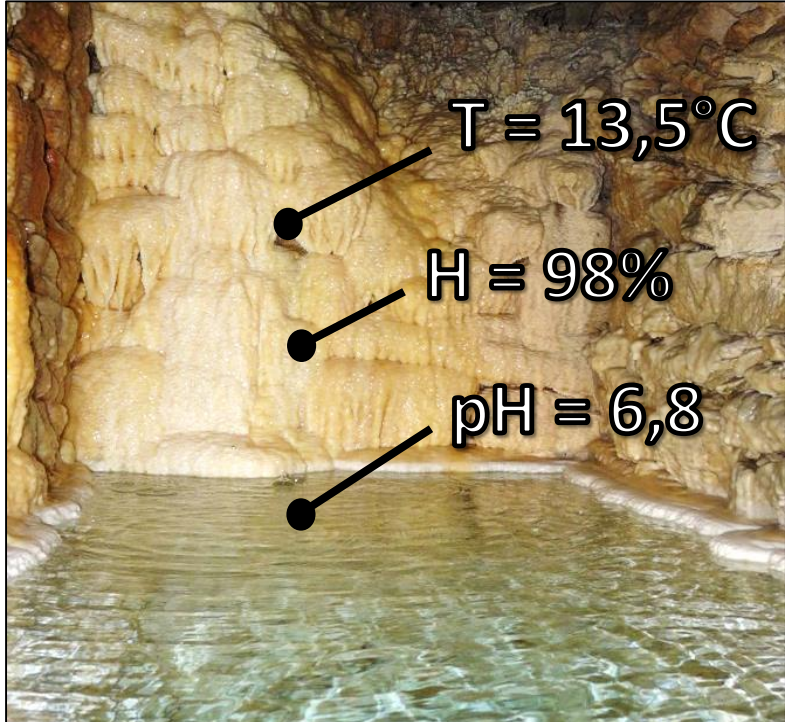
22(21). Trochanteral organ absent or rudimentary..... 23  
Trochanteral organ present (fig.12)..... Entomobryidae 11



## Critères moléculaires

T	A	A	G	A	C	T	T	C	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	C	G	A
T	A	A	G	C	T	T	A	C	T	A	A	T	C	C	G	G	G	C	C	G	A
T	T	A	G	T	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A	
T	C	A	G	T	C	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	A	G	A
T	C	A	G	T	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A	
T	T	A	G	T	C	T	A	C	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
T	C	A	G	A	T	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
T	T	A	G	A	T	T	A	T	T	A	A	T	C	C	G	G	G	C	T	G	A
T	A	A	G	T	C	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
T	T	A	G	C	T	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	T	G	C	T	G	A
T	T	A	G	C	T	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
T	T	A	G	C	T	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
T	T	A	G	C	T	T	A	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
T	A	A	G	T	C	T	T	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
T	A	A	G	T	C	T	T	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
T	A	A	G	T	C	T	T	T	T	A	A	T	T	C	G	A	G	C	T	G	A
T	A	A	G	A	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	G	A	A	C	A	G	A
T	A	A	G	C	C	T	T	T	T	A	A	T	T	C	G	T	T	C	A	G	A

## Critères écologiques



T = 13,5°C

H = 98%

pH = 6,8

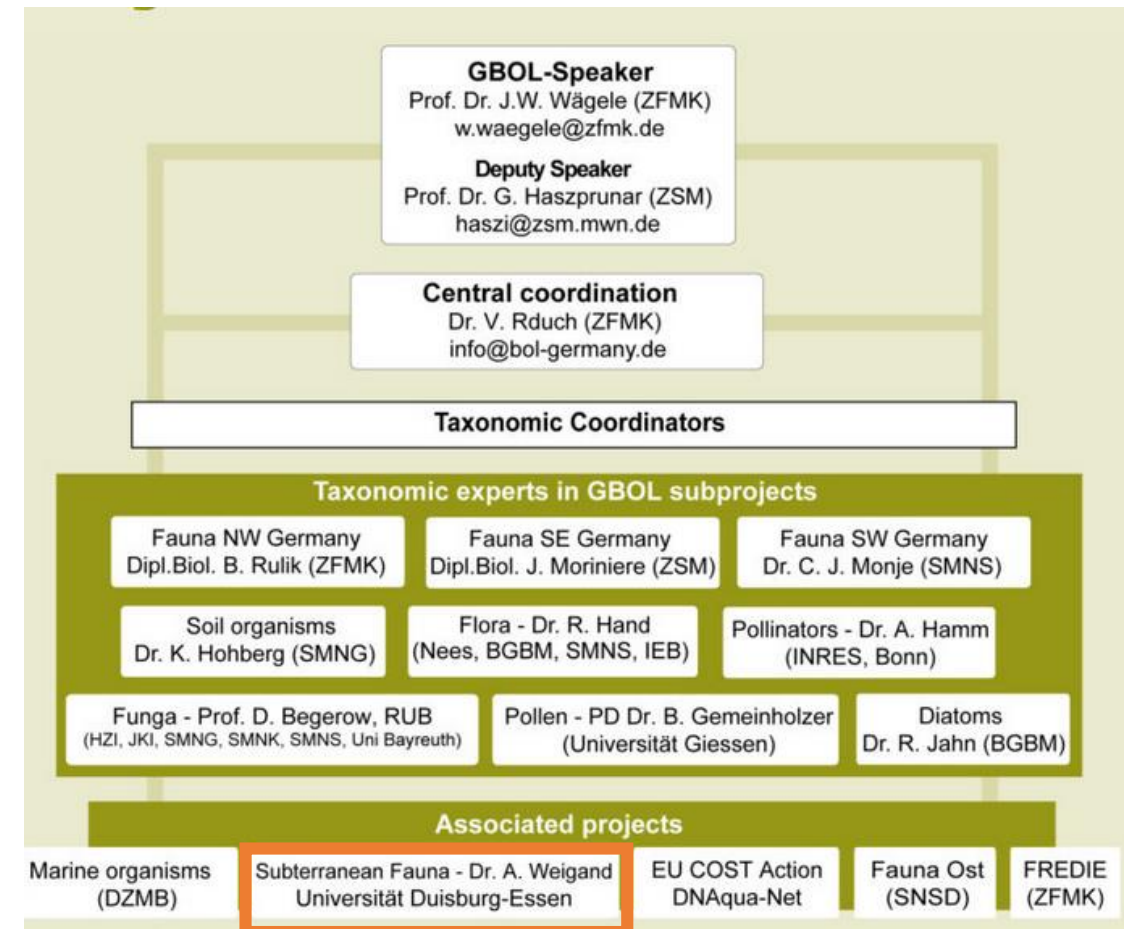
**Des Questions ?**



# Projet existant : GBOL-project 'Subterranean Fauna'

## DNA Barcodes go Underground

Une partie du projet German Barcoding of Life  
Sur des échantillons collectés dans les grottes



Written by: Alexander M. Weigand (Goethe University Frankfurt)

# Autres applications

la lutte contre le commerce illégal d'espèces menacées (Eaton *et al.* 2010),

la lutte contre le **commerce de bois abattu illégalement** (Lowe *et al.* 2011)  
-> si on pouvait identifier les morceaux de bois des carrières !!

Identifier des rapidement espèces invasives / composition d'un plat

Identifier et lutter contre les ravageurs (Greenstone *et al.* 2011)

