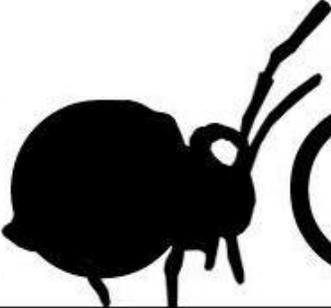


Taxonomie moléculaire : Le BARCODING

Stage biospéléo 12-13 septembre 2020

Marina FERRAND



BI  **CAF**

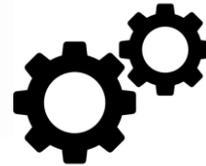
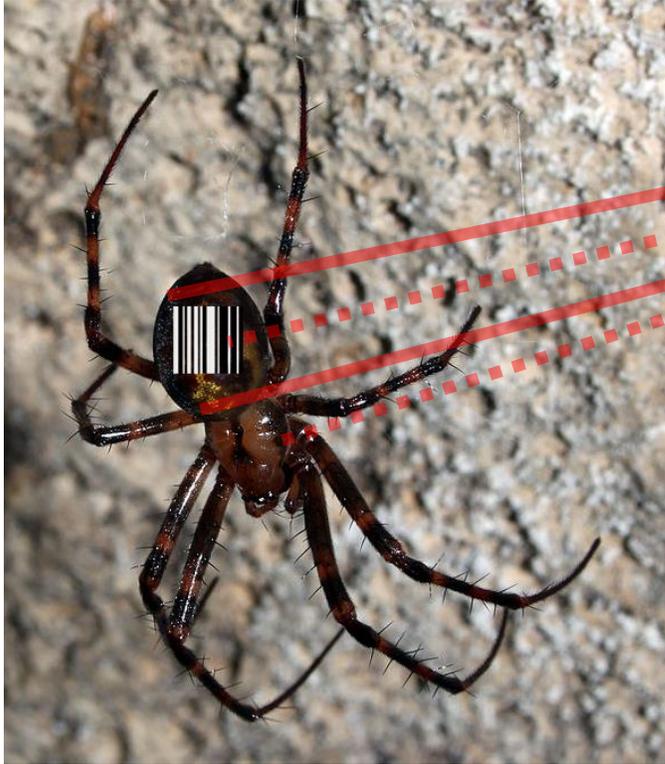
INVENTAIRE BIOSPELEOLOGIQUE DES
CARRIERES SOUTERRAINES FRANCILIENNES



Inventaire
National du
Patrimoine
Naturel



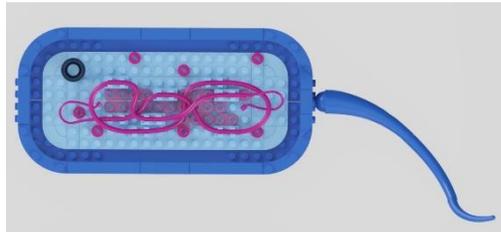
Principe de Barcoding



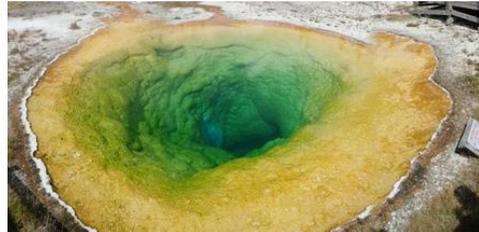
Analyser le code d'un specimen

Comparer avec une base de données de noms/code

Règnes du monde vivant



Bactéries



Archées



Protistes
(ex : amibe, paramécie...)



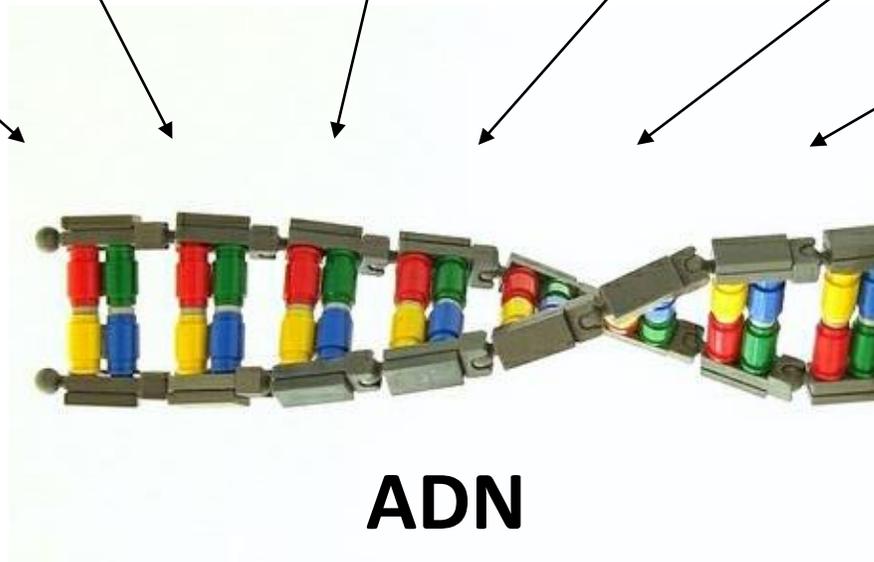
Plantes



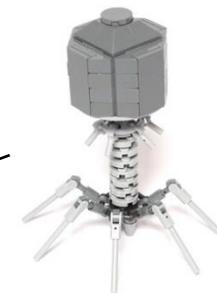
Champignons



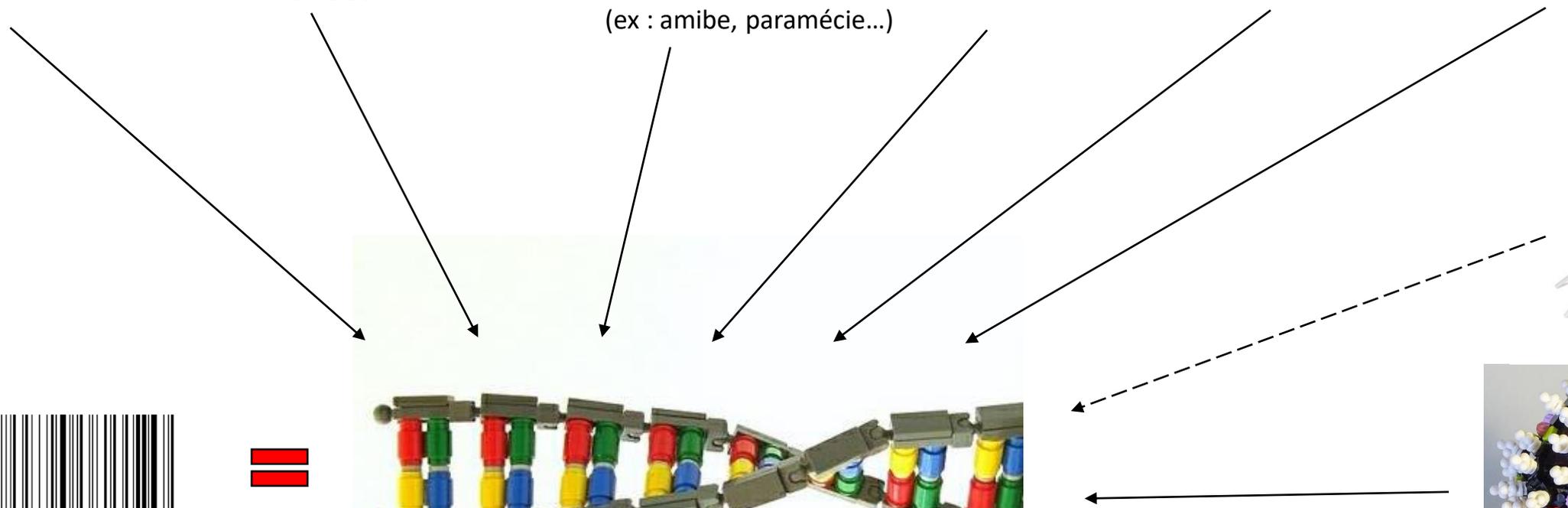
Animaux



ADN



Et les virus



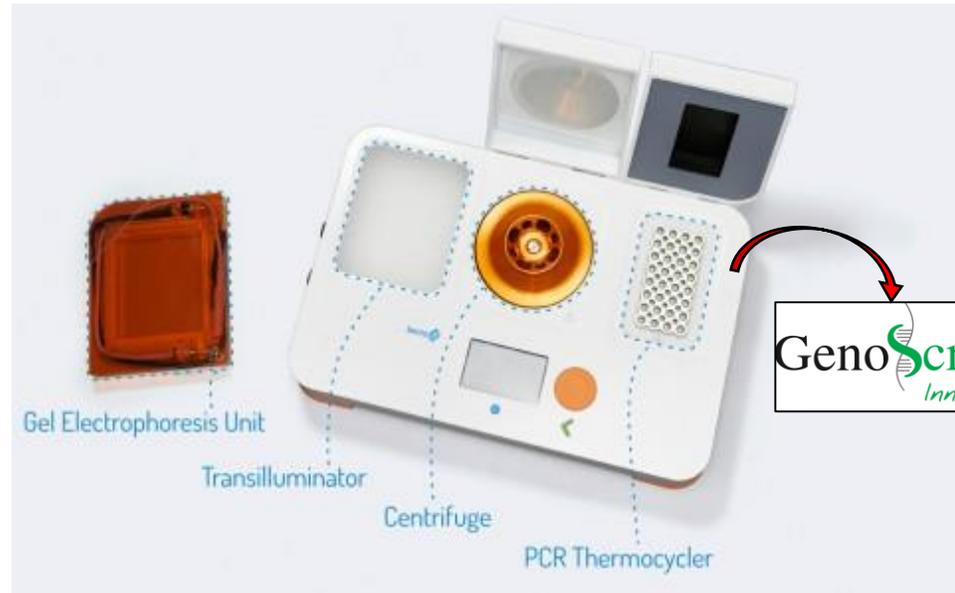
En pratique...



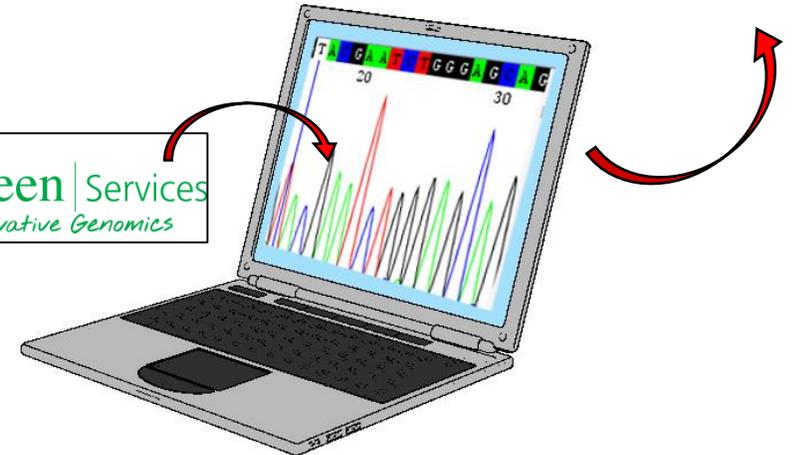
Identification



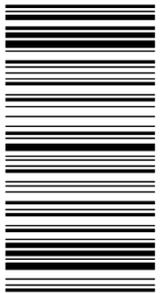
Amplification / Séquençage



Base de données



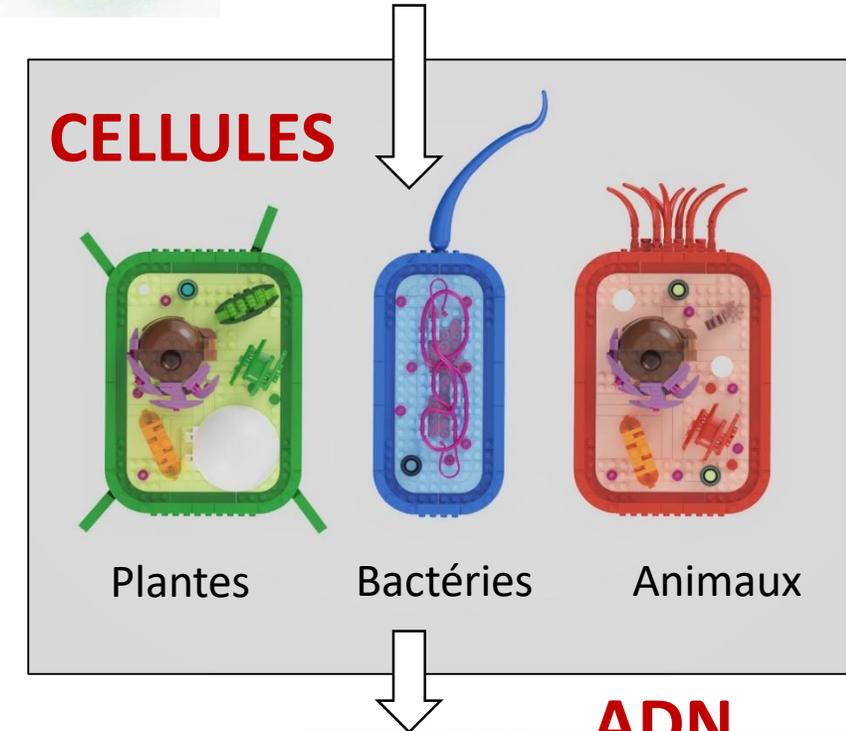
Code barre = séquence ADN



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

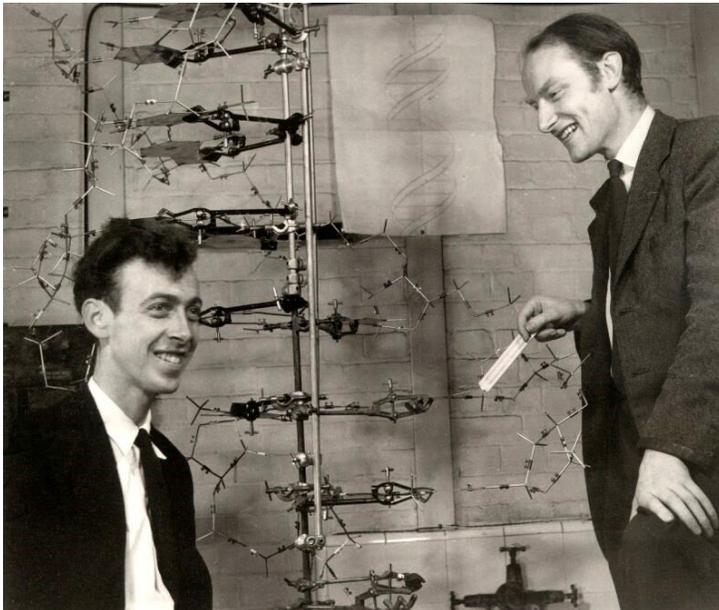
Isolation molécule

1944 : Avery, MacLeod et McCarty

Vecteur de l'info génétique

1953 : Watson and Crick

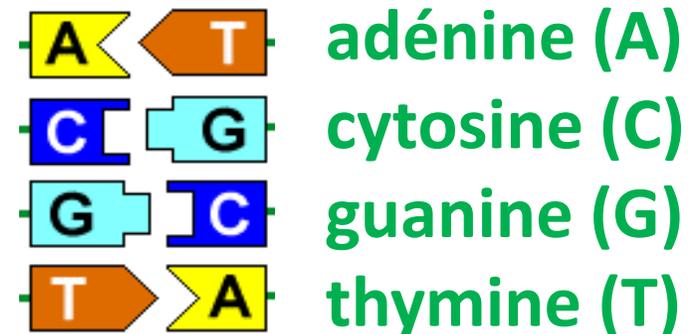
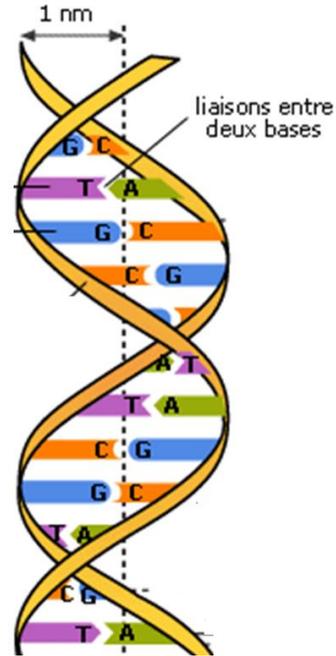
Structure double hélice



Structure : double hélice enroulé
constitué de 2 brins antiparallèles

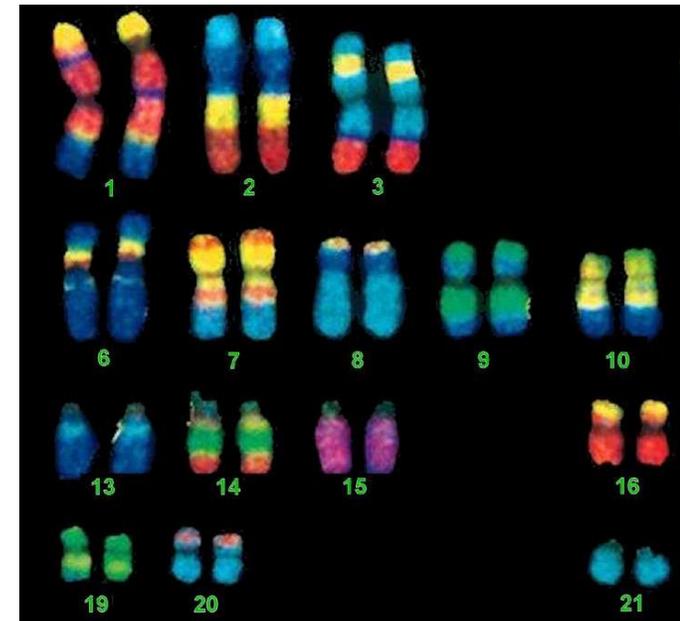
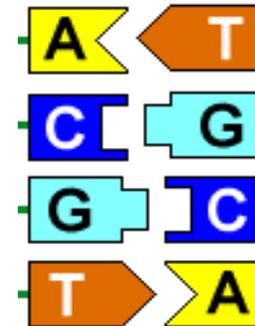
Structure Externe :
phosphate et de sucres

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



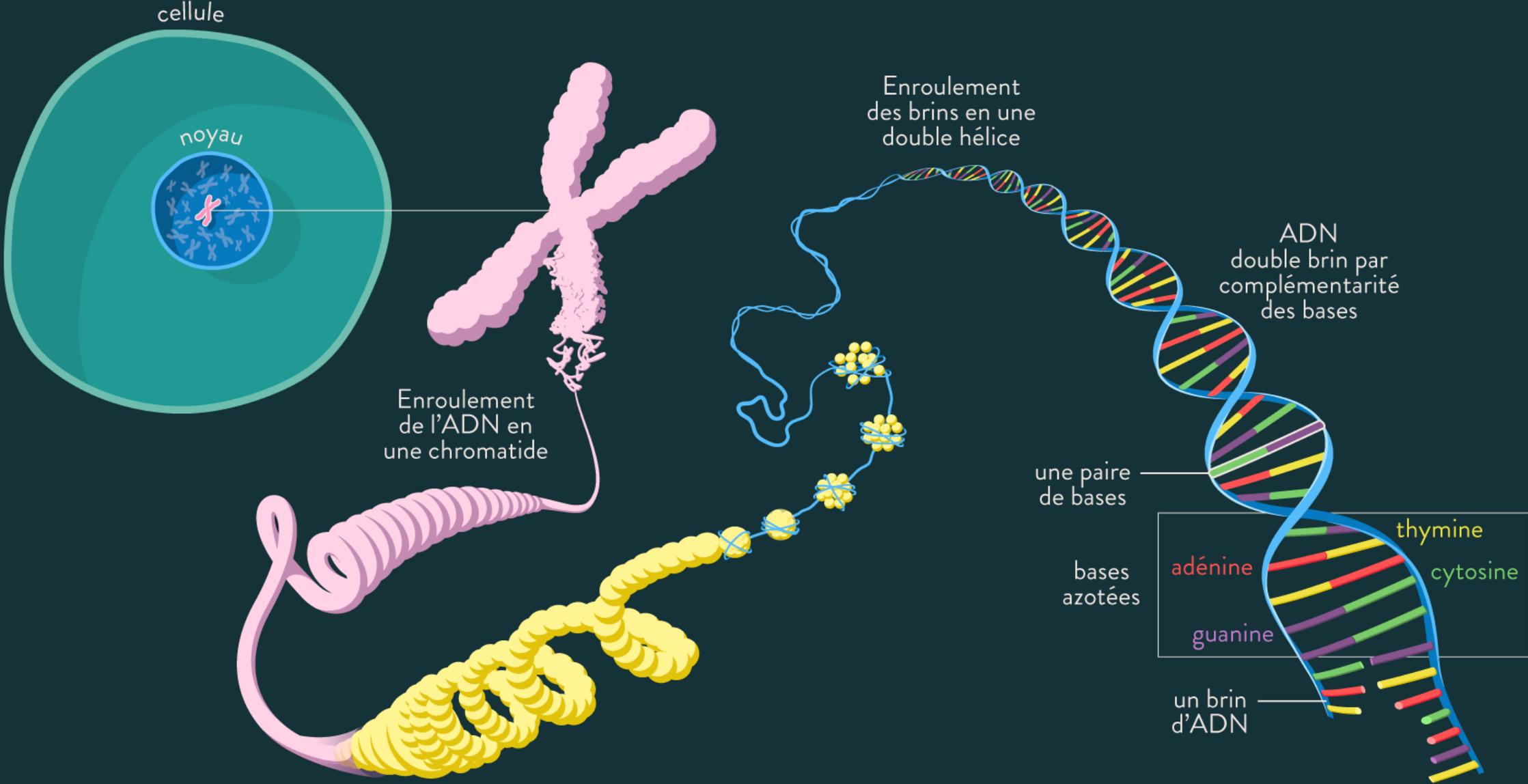
Chromosomes

- 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



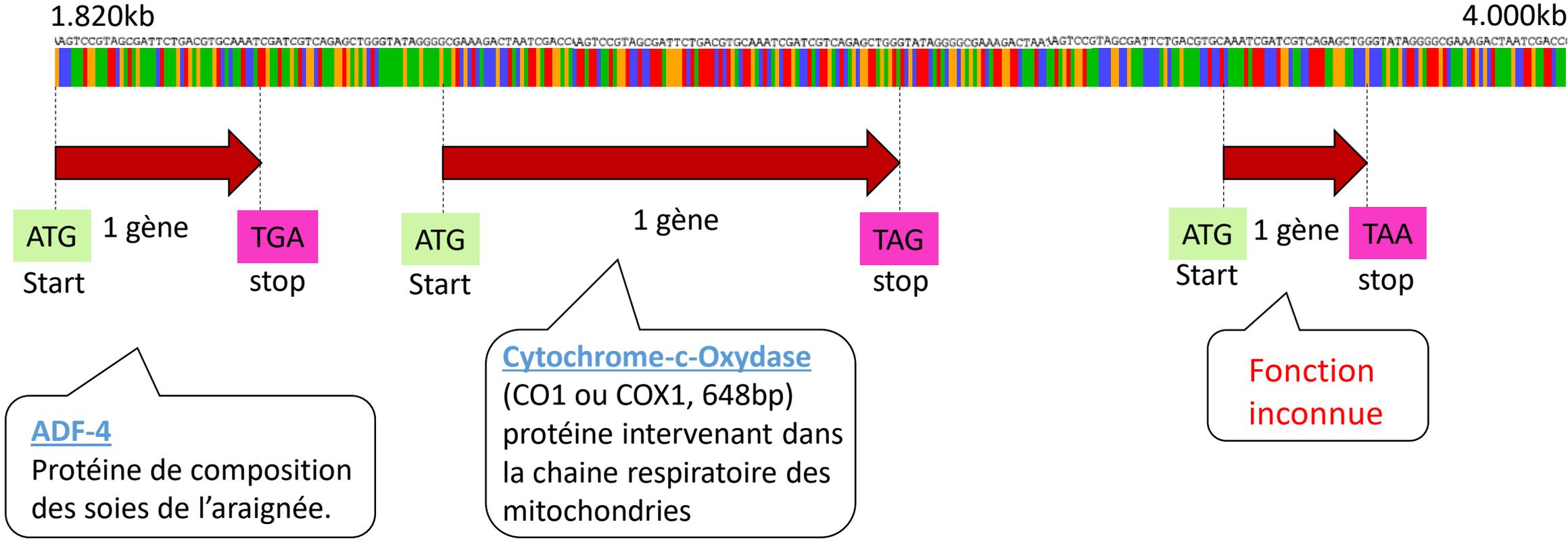
Récapitulatif

ADN et chromosomes



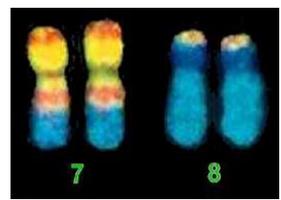
Annotation de la séquence : LES GENES

- Partie localisée sur une position physique sur l'ADN,
Correspond à une unité fonctionnelle



Quelles différences Entre les espèces ?

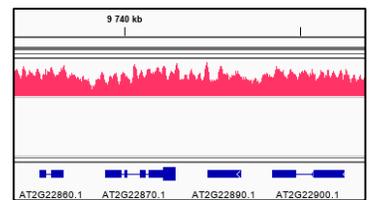
Nb de Chromosomes



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>Leptospirosa</i> sp.)		1	0,003	3 600
<i>Tomocerus minor</i>		12	0,332	

Génome estimé

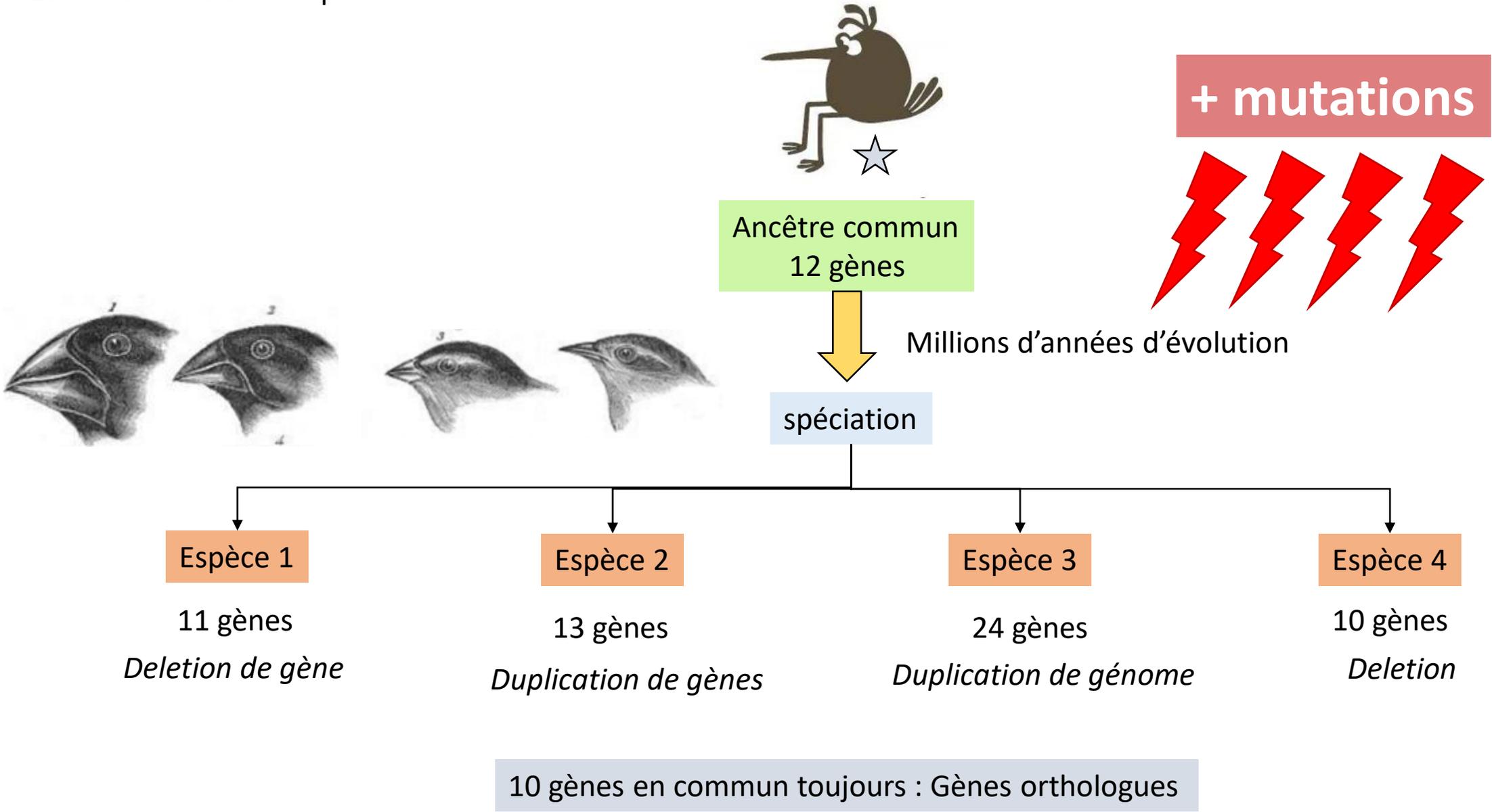
<i>Ver de terre</i>		36	?	
Acarien (<i>Oribate</i>)		?	?	
Poisson rouge		100	0,15	
Chien		78	?	

Point commun entre espèces ?



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

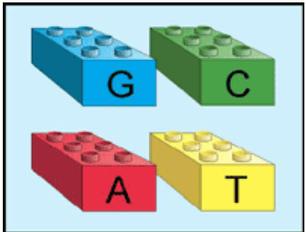
Évolution du vivant depuis 3 milliards d'années



Les mutations ?



AVANT



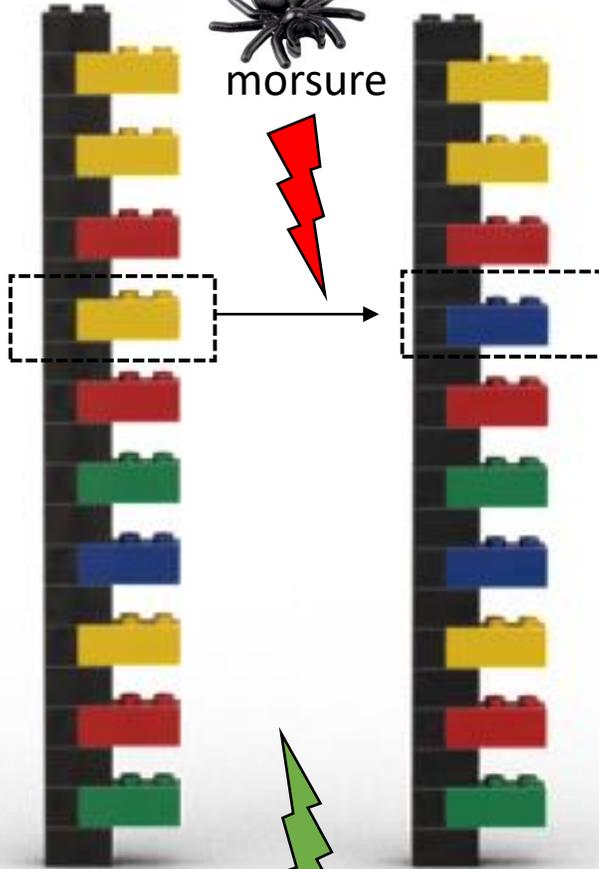
Nucléotides

'normal'

mutant



morsure



Toxic avanger



spiderman

APRES



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_EF</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 :

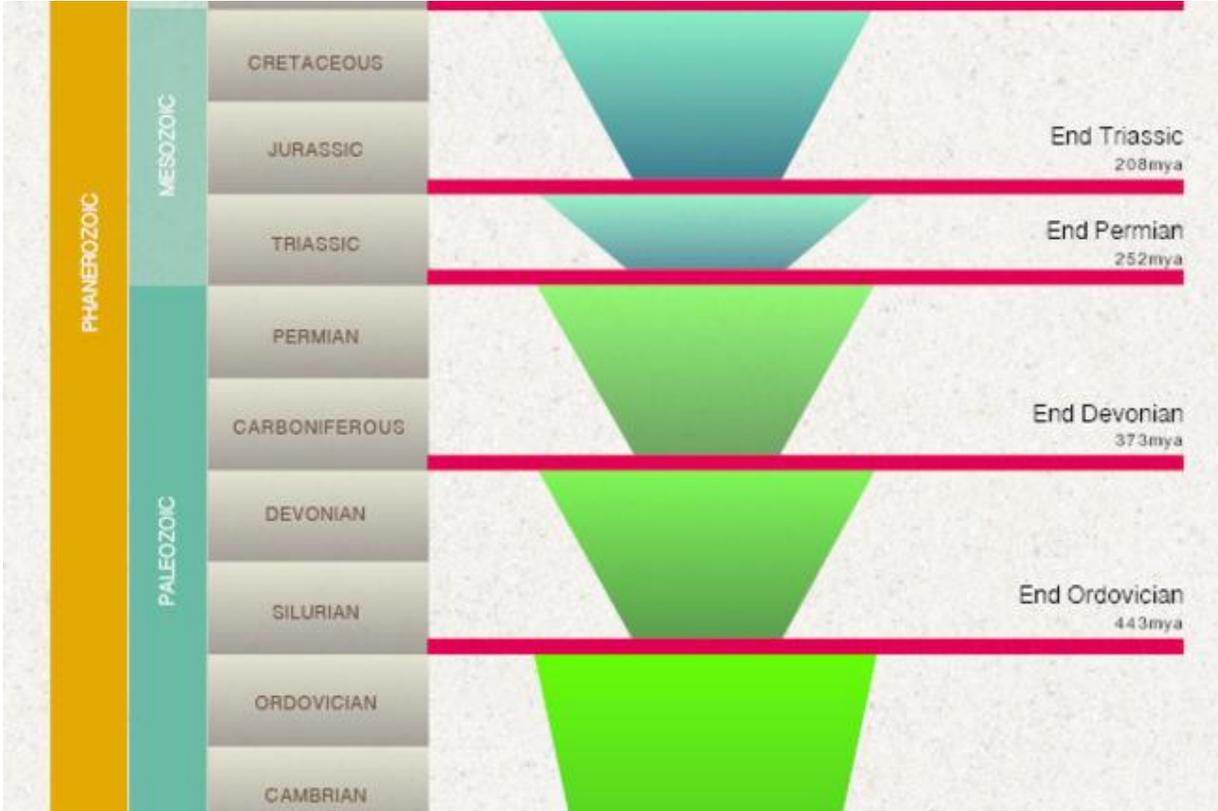
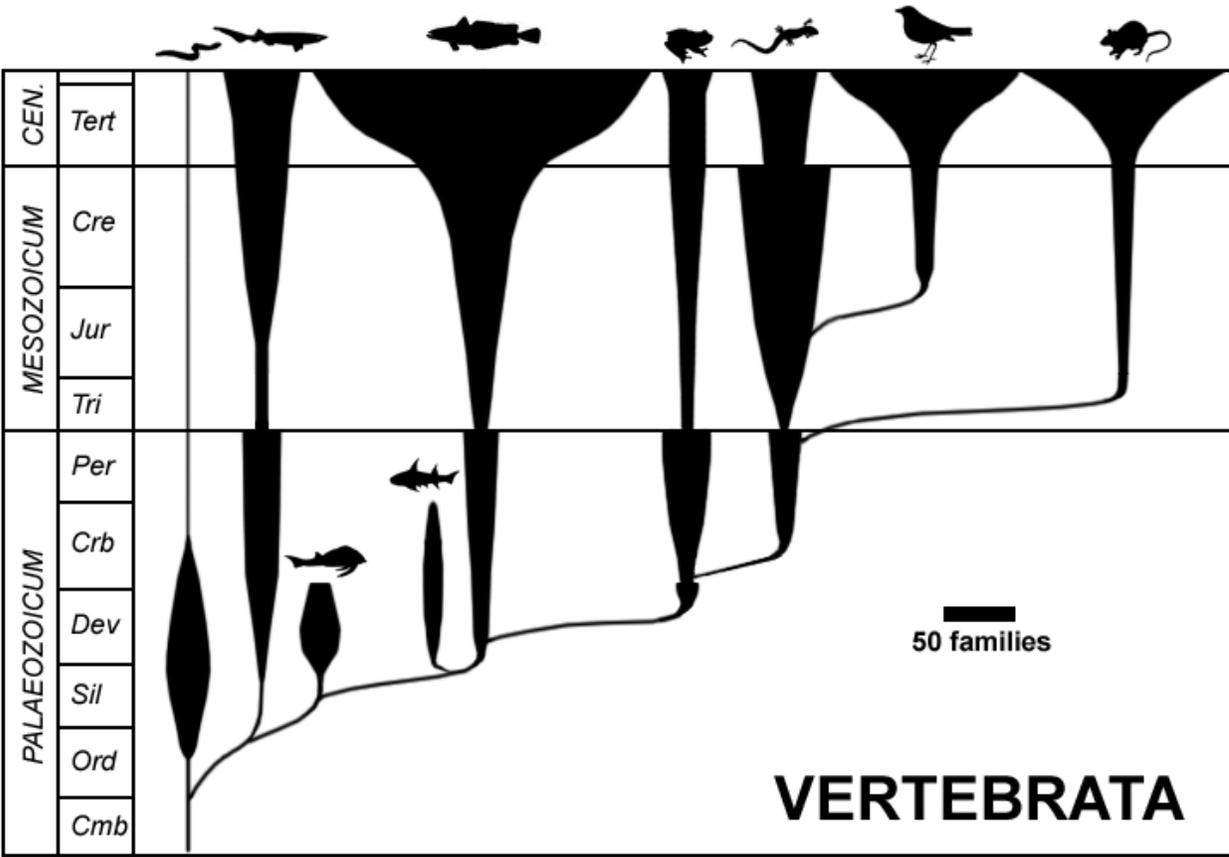
- pour discriminer les espèces.

Moteur 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

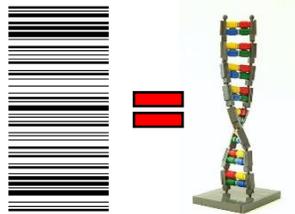
**Revenons au
barcoding**

DNA-Barcoding : de quoi on a besoin ?



+ Centrifugeuse

extraction ADN



1984 : PCR par Kary Mullis

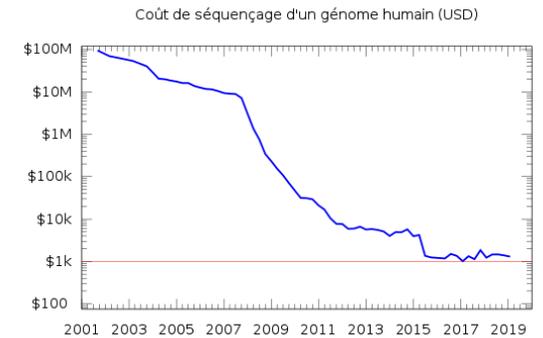


Amplification de l'ADN

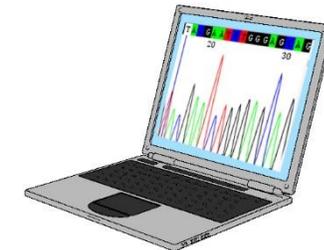


1977 : Séquençage Sanger

2003 : génome humain



Séquençage



```
CTATTATTAATATCGGGCGGGGTATGAGATGGAAGGGTA  
GTATTATTAATATCGGAGTGGGGTATAGTATGAAGGCTT  
CTATTATCAATATCGGTACTTTGGGATGAGATGGAAGGCTT  
CTATTECAATATCGGAACTTTGGGATATATGAAAATT  
GTATTATTAATATCGGAACTTTGGTATGAGATGGAAGGCTT
```

DNA-Barcoding

Concept Barcoding :

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

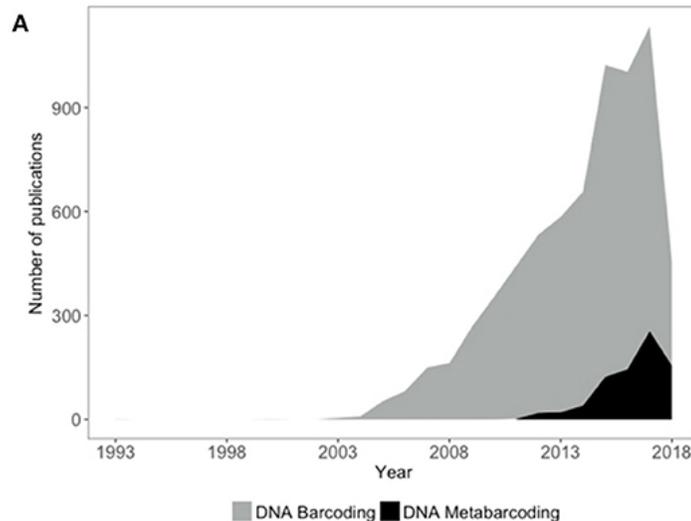
2010 : iBOL

(*International Barcode of Life*)

Grande bibliothèque de référence de séquences d'identification

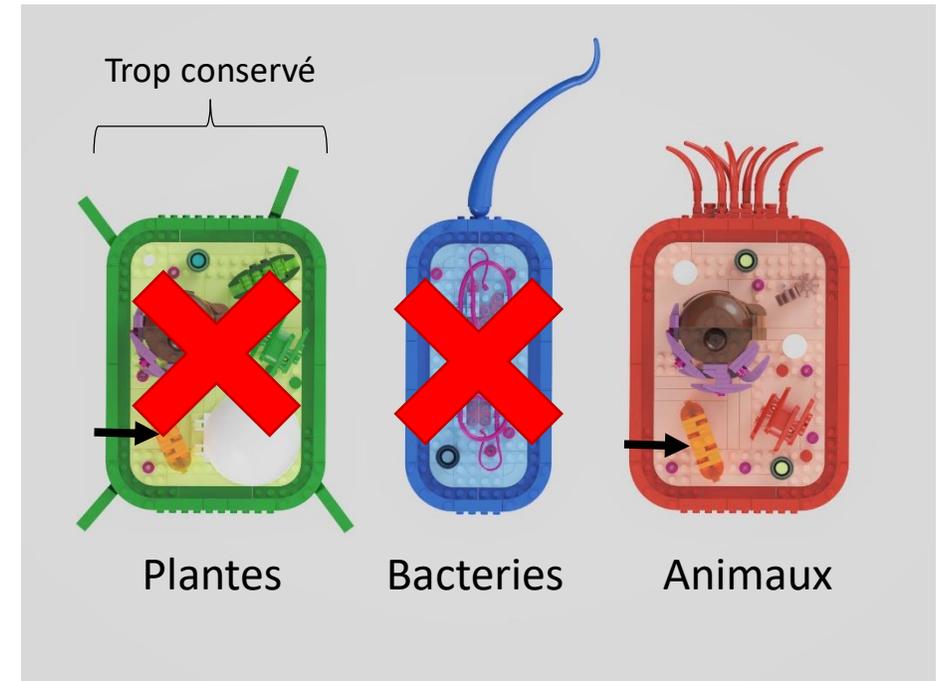


Base de données ?



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



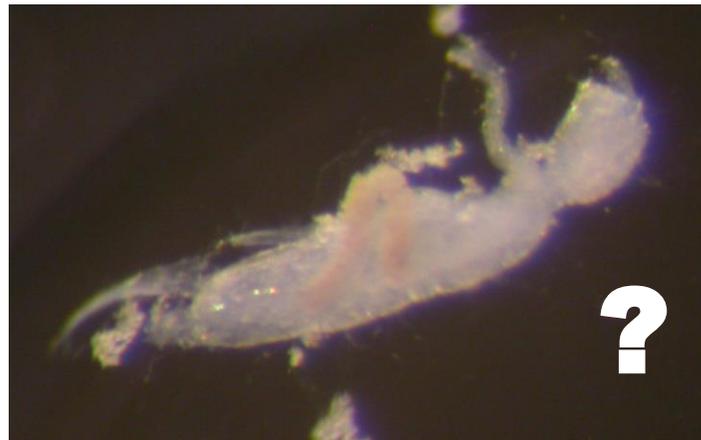
Kryptonesticus eremita
Mâle



Kryptonesticus eremita
femelle



Juvénile



Echantillon abîmé



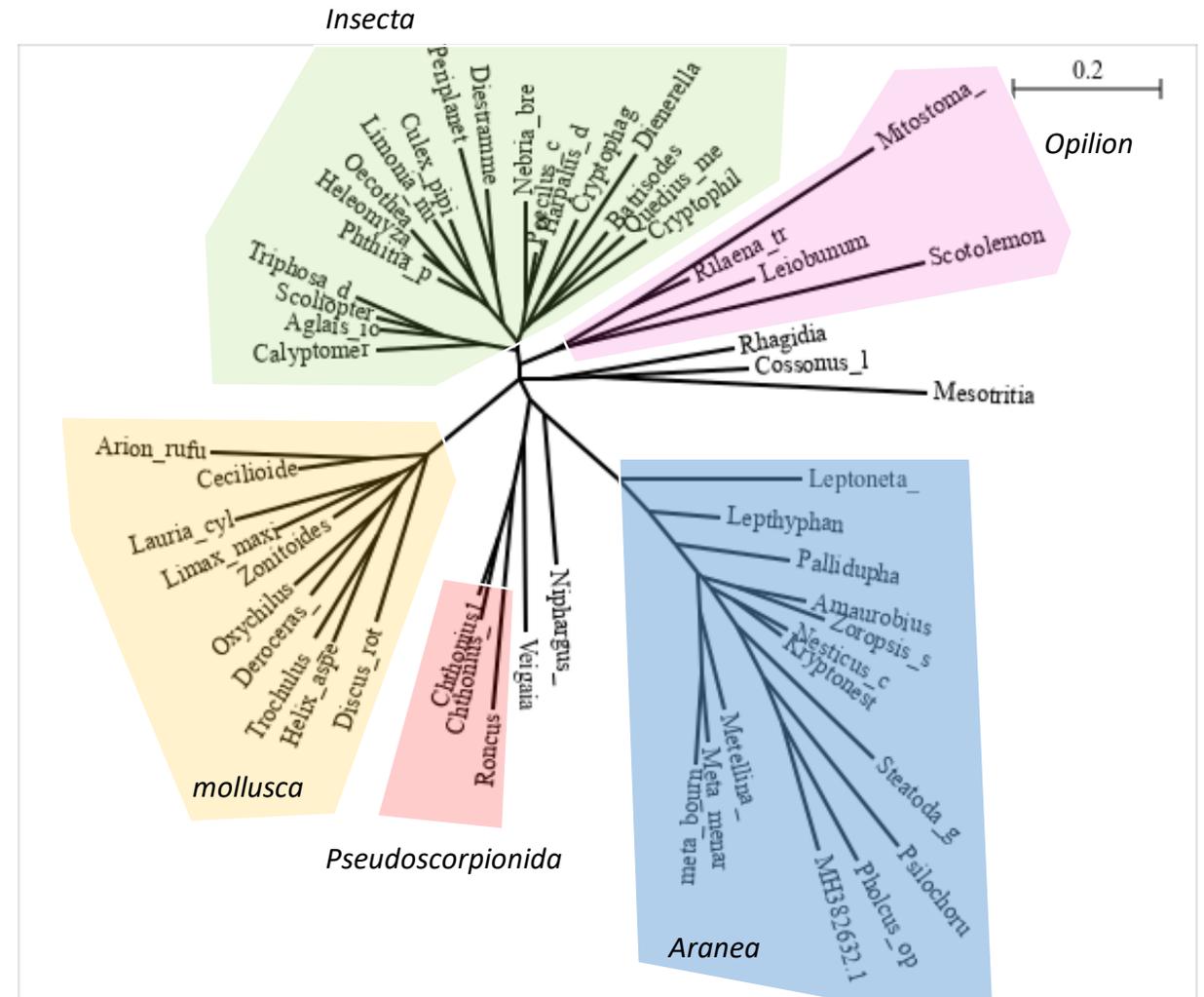
Larve

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



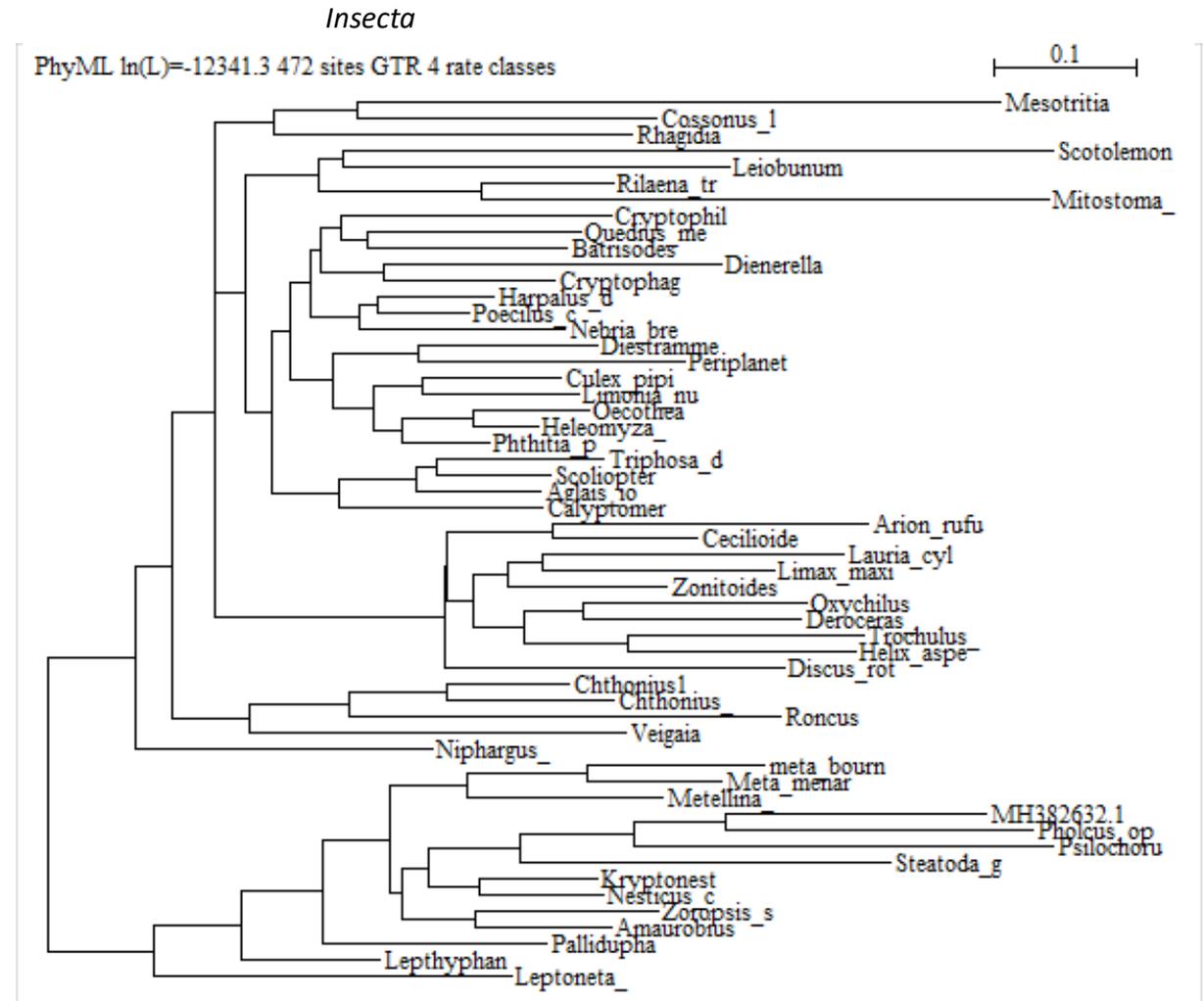
myPhyl tree on COI sequence from NCBI Nucleotids

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

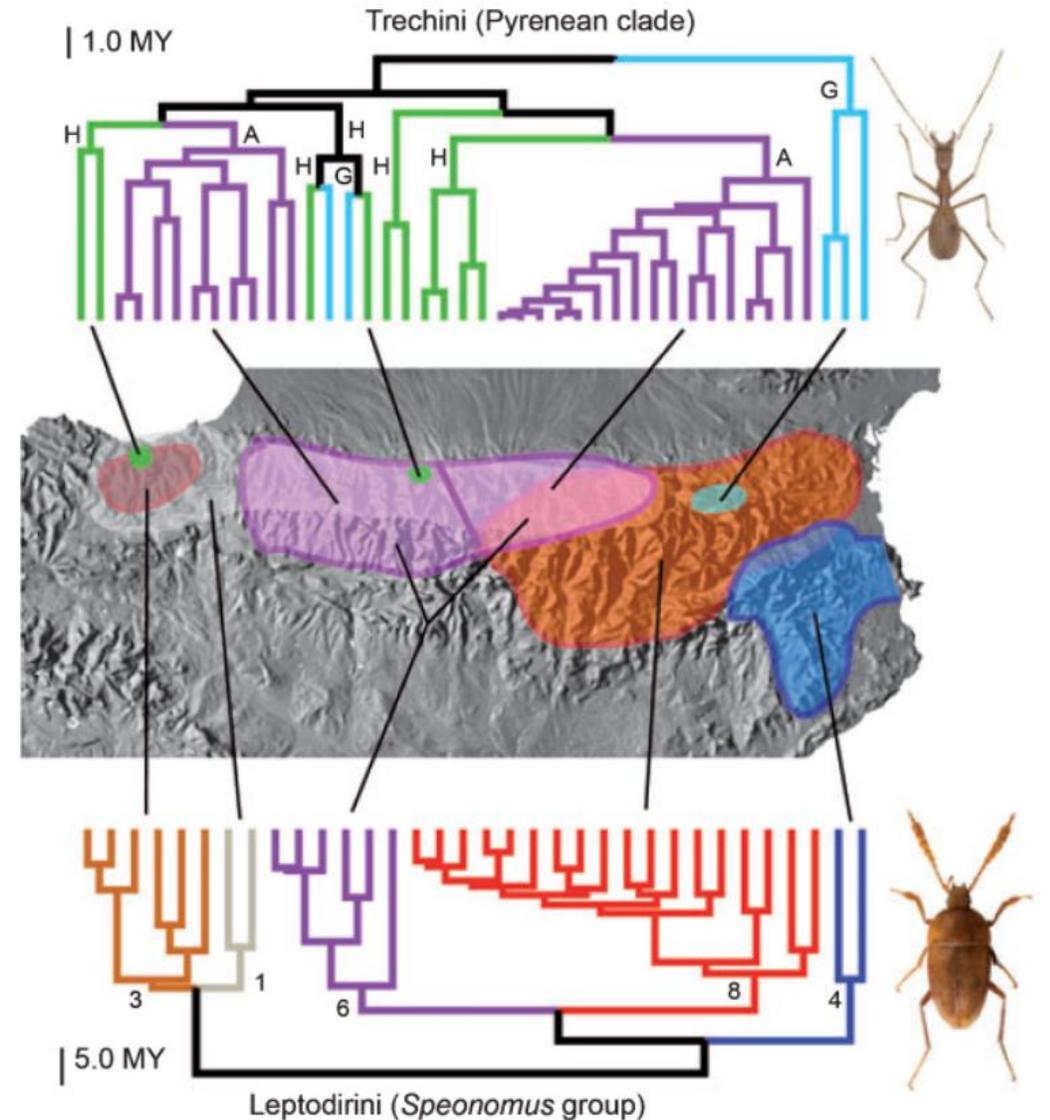
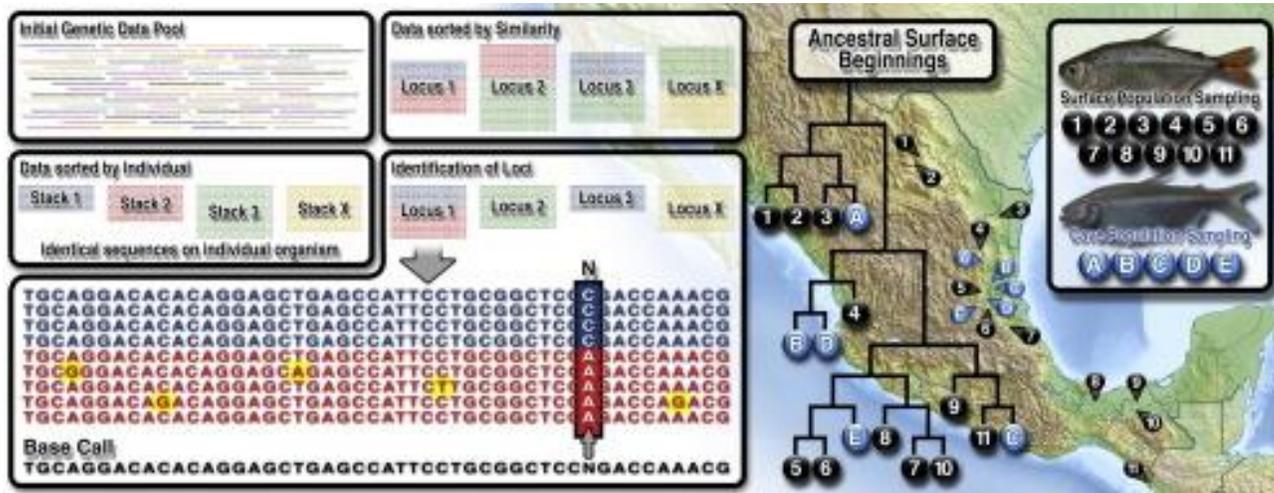
Phylogéographie

Comparer répartition Cave / Surface

Entre plusieurs espèces.

Hypothèses sur évolution / origine du peuplement

Description microhabitat : isolation des espèces = spéciation



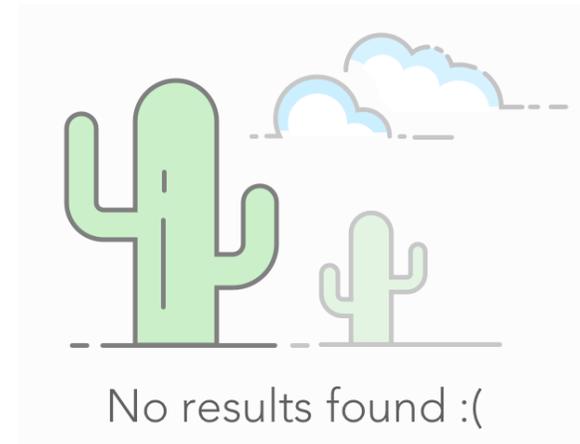
<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2017.0193>

<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

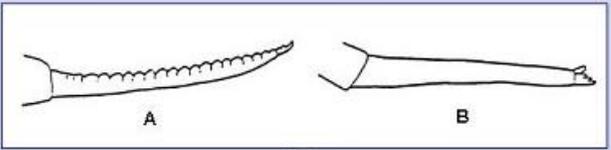
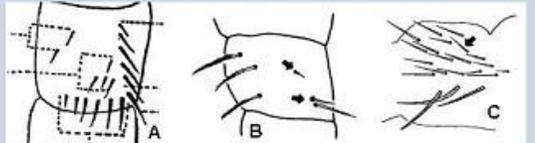


Fig.11.

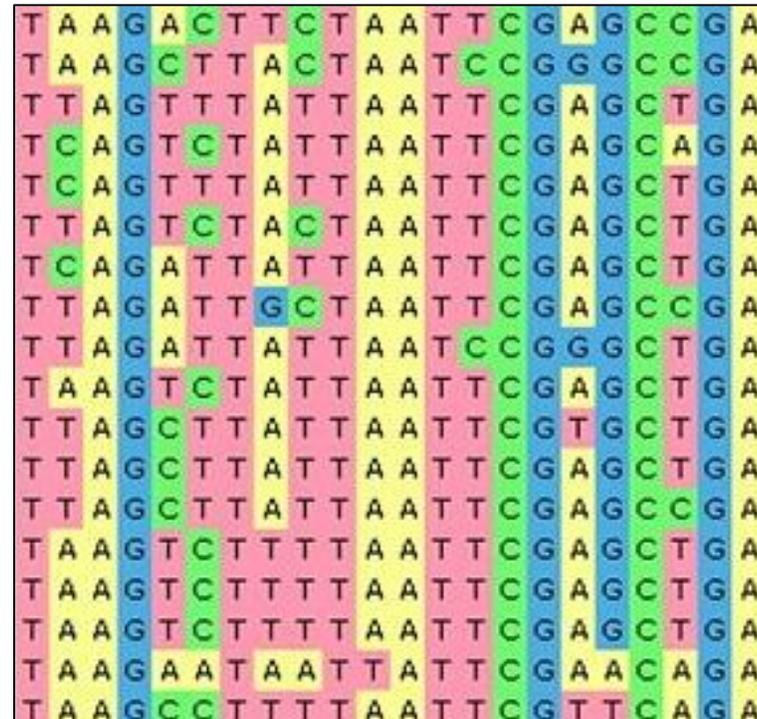
20(19). Antennae five or six segmented..... Entomobryidae 7
Antennae four segmented..... 21

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

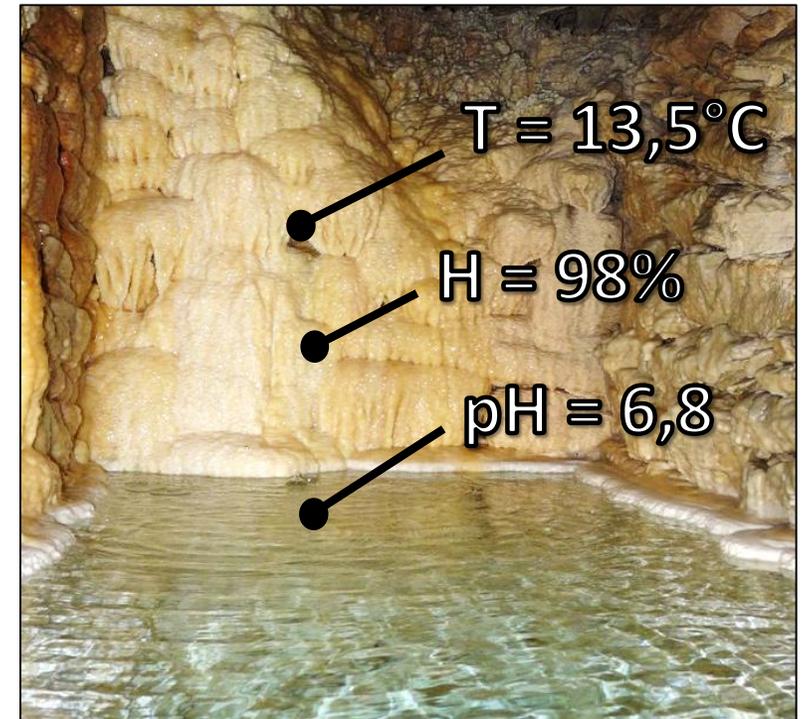
22(21). Trochanteral organ absent or rudimentary..... 23
Trochanteral organ present (fig.12)..... Entomobryidae 11



Critères moléculaires



Critères écologiques



Des Questions ?

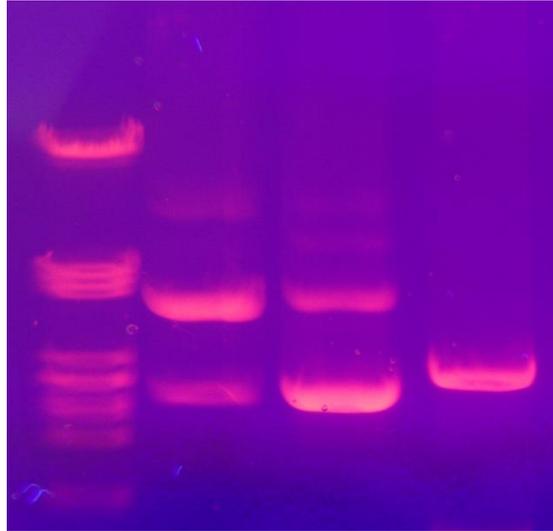


Slides supplémentaires

Modelisation 3D



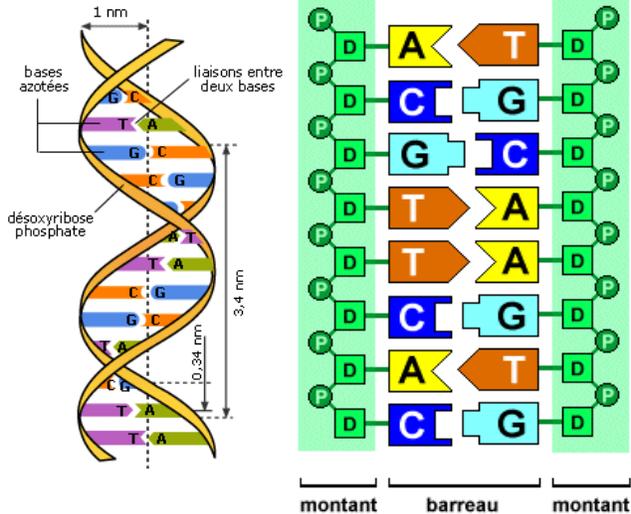
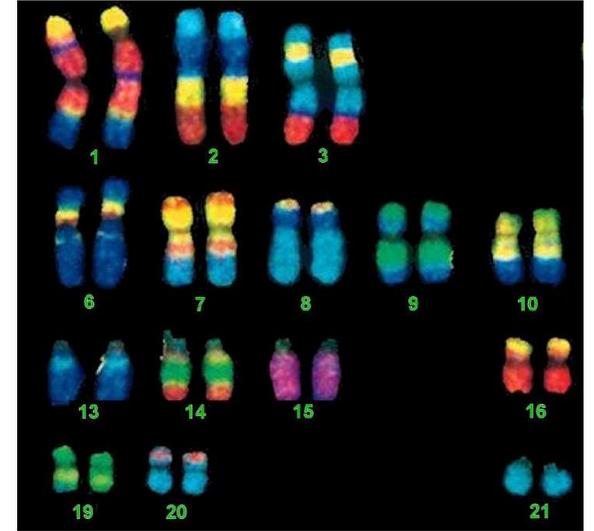
Analyse Révélation fluorescente



Chromosomes



Chromosomes et fluorescence

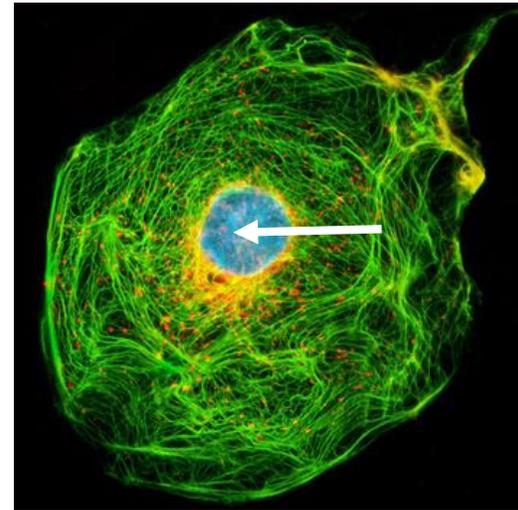


Structures et nucléotides

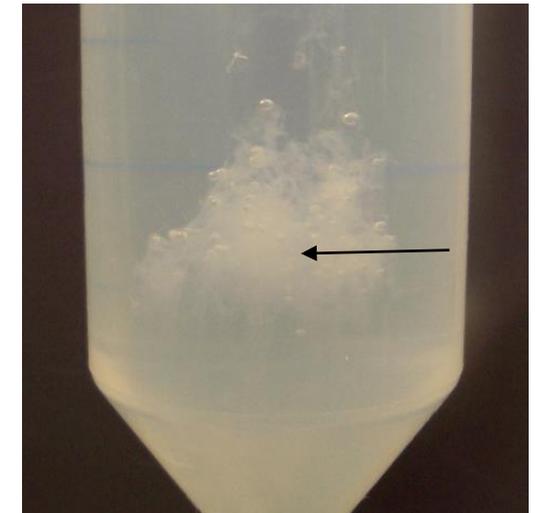
```

sel=0 1 Seq:1 Pos:1|1 [Heleomyza ]
Heleomyza _ AAAAAAGGGAGGAGAA AAAAAG AA TAAA GC
Oecothea _ AAAAAAGGGAGGAGAA AAAAAG AA TAAA GC
Phthitia_p TGGTACGGG AAGGATAAAAGAG AA TAA GC
Culex pipi AAAAAAGGG AAGG AAGGAA TAAAAG GC
Limonia_nu AAAAAAGGG AAGGAAAGGAA TAA TAA GC
Poecilus_c TAAACTGGT AA TAAAGAGG TAAAAG GC
Harpalus_d TAAACTGGT AAGG AAGG AAGG GC
Nebria bre TGAACGGT AAGGATATAA TAA TAA GC
Calyptomer AAAAAAGGG AAGGATATAA TAAA GC
Amaurobius AAAAAAGGG AAGGATATAA TAAA GC
Zoropsis_s AAAAAAGGG AAGGACAA TAA TAA GC
Nesticus_c AAAAAAGGG AAGGACAA TAA TAA GC
Kryptonest AAAAAAGGG AAGGATATAA TAA TAA GC
Leptyphan AAAAAAGGG AAGGATATAA TAA TAA GC
Pallidupa CAACACGGT AAGGATATAA TAA TAA GC
Metellina AAAAAAGGG AAGGAAAGGAA TAA TAA GC
Meta menar AAAAAAGGG AAGGATATAA TAA TAA GC
meta_bourn CAACACGGT AAGGATATAA TAA TAA GC
Leptoneta CAACACGGT AAGGATATAA TAA TAA GC
Steatoda_g AAAAAAGGG AAGGATATAA TAA TAA GC
MH382632.1 CAACACGGT AAGGATATAA TAA TAA GC
Pholcus_op CAACACGGT AAGGATATAA TAA TAA GC
Psilochoru CAACACGGT AAGGATATAA TAA TAA GC
Niphargus TGAACGGT AAGGATATAA TAA TAA GC
Cryptophaq TGAACGGT AAGGATATAA TAA TAA GC
    
```

Séquences de nucléotides



Cellule et noyau
fluorescence

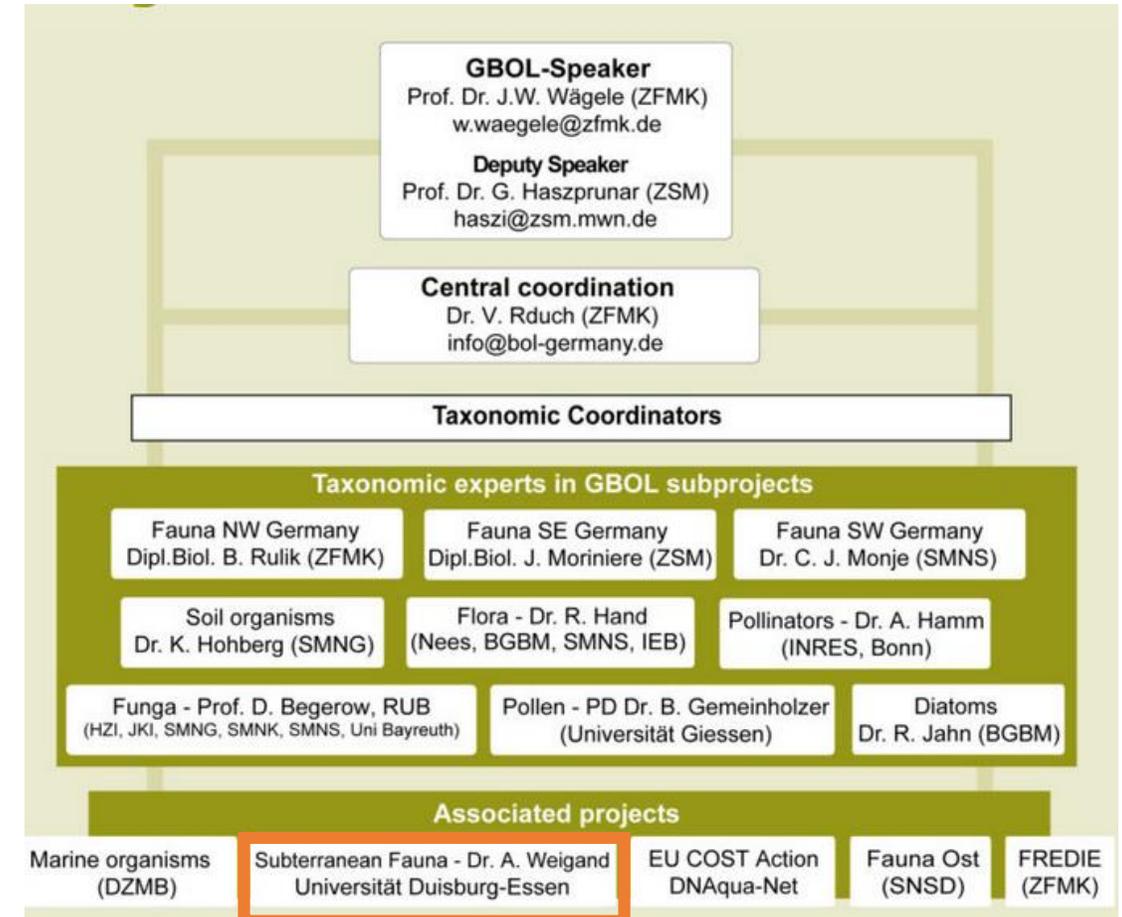


« Méduse » d'ADN

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)

