




INRA
SCIENCE & IMPACT

Barcoding au CBGP :

Où en est le barcoding des arthropodes au CBGP : point d'étape et évolution vers les approches à haut débit

Montpellier
17 / 02 / 2015

J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud



SOMMAIRE




- ❖ Introduction (JCS)
- ❖ Le contexte (JCS)
- ❖ Les projets en cours (JCS)
- ❖ Organisation du barcoding au CBGP (GG)
- ❖ Passage du Sanger au Haut Débit (PC)
- ❖ L'avenir du barcoding au CBGP (JCS)

INRA
SCIENCE & IMPACT

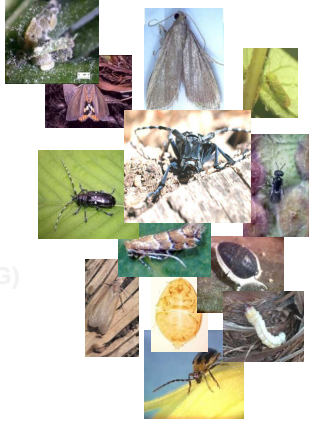
J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud


.02
17 / 02 / 2015



Introduction : deux ans déjà!

- ❖ Introduction (JCS)
- ❖ Le contexte (JCS)
- ❖ Les projets en cours (JCS)
- ❖ Organisation du barcoding au CBGP (GG)
- ❖ Passage du Sanger au haut débit (PC)
- ❖ L'avenir du barcoding au CBGP (JCS)





J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.03
17 / 02 / 2015



On ne vous parlera pas d'Icerya

Groupe de recherche
Identification,
Caractérisation et
Evolution des insectes
Ravageurs et auxiliaires
en sYlvi- et Agriculture



Questions biologiques ?
Qui sont-ils, sont-ils des complexes, que font-ils?
Quelle est leur histoire évolutive?
Peut-on prédire et contrôler leurs impacts dans des conditions changeantes?
Comment s'assemblent leurs communautés (interactions / réseaux trophiques)?

Qui?
Astrid Cruaud CR INRA
Gérard Delvare Cadre CIRAD
Jean-Yves Rasplus DR INRA
Jean-Pierre Rossi DR INRA
Jean-Claude Streito IR INRA
Gwenaëlle Genson TR INRA
Eric Pierre AI INRA
Fernando Farache (Doctorant)
Martin Godefroid (Doctorant)
Lillian Rodriguez (Doctorante)

Comment? (Compétences / Outils)
Systématique, Phylogénie, phylogéographie, génétique des populations, écologie spatiale, écologie du paysage.

Analyse morphologique, Biologie moléculaire, Bio-informatique, data mining, analyse du paysage, sig, imagerie.







Quels produits:
Bases de connaissances liées à des outils de diagnostic disponibles sur le web.
Collections de références et d'ADN
Publications scientifiques, Logiciels, Protocoles, outils Smart Phone, écoles chercheurs, sessions de formations, cours, mook



J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.04
17 / 02 / 2015

Programmes dont on ne vous parlera pas non plus!

Barcoding	BIOFIS , Agropolis Fondation (2011-2015) => Bioagressors and invasive species: from individual to population to species	
	AuxiGene , SPE (2013-2015) => Identification moléculaire d'auxiliaires des cultures	
	Coleotool , Casdar (2014-2016) => Développement d'outils moléculaires en vue d'identifier les principaux charançons ravageurs des crucifères et leurs auxiliaires parasitoïdes	
Caractérisation	Lycovitis , Smach (2014-2016) => Du diagnostic visuel au séquençage : Sys3D un outil de diagnostic intégratif pour la tomate et la vigne	
	Tricho-NG , SPE (2013-2015) => Développement et analyse de marqueurs de nouvelle génération pour la caractérisation et la phylogénie des <i>Trichogramma</i> (Hym. Chalcidoidea)	
	TriPTIC , ANR (2015-2018) => <i>Trichogramma</i> for plant protection: Pangenomics, Traits, and establishment Capacities (labellisée Ecophyto2018, Terralia, GIS BV)	
Biosurveillance	Q-Collect , FP7 (2013-2015) => Collections d'organismes de quarantaine	
	GeeK , Smach (2014-2016) => Google trends network & pest outbreak	
	Thèse M. Godefroid , Smach (2013-2015) => Intégrer la phylogéographie dans les modèles de distribution d'espèces (scolytes, mouches de fruits)	

Introduction : deux ans déjà!

Le barcoding au CBGP en janvier 2013

Arthropodes quarantaine CBGP - UZF LSV QBoL FP7	Arthropodes émergents CBGP Biofis	Ravageurs du Patrimoine M. Martinez F. Fohrer CICRP	Aphididae A. Cœur d'acier	Tortricidae des vergers J.Y. Rasplus C. Cocquempot CTIFL
Agriotes M. Martinez M. Freitas S. Puissant Bayer	Psammotettix M. Martinez M. Freitas Bayer	Psyllidae C. Cocquempot N. Sauvion	Agromyzidae M. Martinez R. Gil Ortiz	Cerambycidae C. Cocquempot
Prédateurs et parasitoïdes de Pucerons CBGP-Rennes Landscaphids	Auxiliaires Lutte biologique CBGP-Sophia AuxiGen	Phytoseidae M.S. Tixier Chacidoidea G. Deivare A. Cruaud J.Y. Rasplus	Divers CBGP Tetranyques Spodoptera Ostrinia Etc.	Agro Pests CBGP LSV

Projets terminés

EDIT, FP6, => Réseau d'Excellence en Systématique => insertion dans les projets européens




DAISIE, FP7, => Base de données des insectes invasifs en Europe, Ouvrages


Q-BOL, FP7 => Outil d'identification moléculaire des arthropodes de quarantaine pour l'Europe (Q-Bank)

BI4I, Speed-Id, BdV Génoscope => séquençage Sanger

Chalci-TOL, NSF (2010-2013) => phylogénie des Chalcidiens, analyse des traits de vie

Landscaphid => ANR




J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.07
17 / 02 / 2015

Les codes-barres

A quoi ressemble un code-barre ?



➔

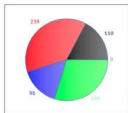
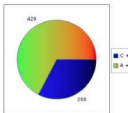
Original sequence

```

AACCTTATACCTTTATTTTGGAAATTTGAGGAGAAAGGAGAACTTCATTAAGAAATTT
ACTCCAGACAGAAATGAGAGGCTCCGATTTTATTTGGAAATGCGAAATTTATATATTT
TATTTTGGAGAGAGAGAGAGATTTATATATTTTATATATATATATATATATATATATAT
GGTTTTGGAAATTTGAGCTTAAATTTTATATATATATATATATATATATATATATATAT
AAATAAATATAAGATTTTGGATTTCTCCCTCCCTCTCTTTATTTATTTATTTATTAAGG
GGTTTTGGAAATTTGAGCTTAAATTTTATATATATATATATATATATATATATATATAT
GGCTTATGAGAGAGAGAGAGATTTGATATTTTATATATATATATATATATATATATAT
TGGATTTTGGAAATTTGAGCTTAAATTTTATATATATATATATATATATATATATATAT
AACCTTATACCTTTATTTTGGAAATTTGAGGAGAAAGGAGAACTTCATTAAGAAATTT
ATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
TACATCATTTTGTATCCAGCTGGTGGAGGGATCCA
                    
```

Show reverse-complement sequence

Basics statistics (Total length : 637)

Click me to show DNA to protein data ...

Sequencing primer F: M13F(-21)
No file available


Traces files F: 1. LCO1490puc_11
2. LCO1490Hem1_11

PCR primer F: No file available

Traces files R: M13R(-27)
No file available

Sequencing primer R: 1. HCO2198puc_11
2. HCO2198Hem1_11

PCR primer R:



J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.08
17 / 02 / 2015



Contexte




- ❖ Introduction (JCS)
- ❖ **Le contexte (JCS)**
- ❖ Les projets en cours (JCS)
- ❖ Organisation du barcoding au CBGP (GG)
- ❖ Passage du Sanger au haut débit (PC)
- ❖ L'avenir du barcoding au CBGP (JCS)




J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.09
17 / 02 / 2015




Contexte



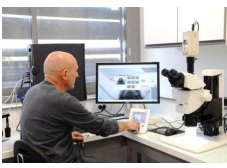
Besoin d'outils rapides, fiables pour le Diagnostic, la Détection et l'identification.

- ❖ Ce besoin augmente. Pourquoi?
 - Diminution de la couverture chimique (émergences...)
 - Des techniques plus exigeantes en diagnostic (IPM, lutte biol...)
 - Augmentation du nombre d'invasions biologiques (échanges commerciaux et changements de pratiques, climatiques...)
 - Déclin accéléré de l'expertise en taxonomie et diagnostic.
- ❖ L'envoi d'échantillons est peu fréquent en diagnostic courant : coût, difficulté pour trouver un laboratoire, prélèvement difficile, envoi contraignant, délai...
- ❖ Répondre à ce besoin : Action Clé Sys3D du Métaprogramme SMaCH.



J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud



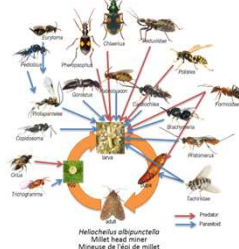
.010
17 / 02 / 2015




Contexte

Besoin d'outils rapides, fiables pour le **D**agnostic, la **D**étection et l'**i**Dentification.

- ❖ On fait actuellement du Barcoding au CBGP et on nous finance dans cette optique appliquée d'outils de diagnostic
- ❖ Le barcoding a d'autres justifications et d'autres sources de financement :
 - ❖ Étude de la biodiversité (SpeedID, Bdv, Bold...)
 - ❖ Écologie fonctionnelle (librairies de gènes...)
 - ❖ Etc.



J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.011
17 / 02 / 2015

Sys3D au champ

Pratiquement comment ça va marcher ?





J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.012
17 / 02 / 2015

Sys3D au champ

Symptôme inconnu :

- utilisation de E-Phytia : ce serait *Phomopsis viticola* ??
- prélèvement échantillon + broyage dans Sys3D
- broyage dans Sys3D
- séquence comparée à la base universelle et validée



J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.013
17 / 02 / 2015

Sys3D au champ

Symptôme inconnu :

- résultat *Xyllela fastidiosa* maladie de Pierce
- retour sur Ephytia : c'est quoi ? biologie ? symptômes ? contrôle ? quarantaine ? vecteurs...
- signalement via photo et VigiPlant

Rebroyage :
Homalodisca vitripennis



J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.014
17 / 02 / 2015

Sys3D Création d'un outil universel de diagnostic à destination des professionnels et de la protection des plantes


Que faut-il pour que ça marche ?

- Une base de données
- Des interfaces web
- Des outils d'analyse

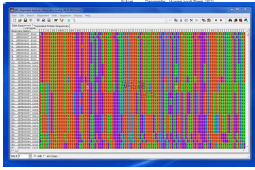
une base de données phénotypique, génétique et bibliographique sur les agents pathogènes et les ravageurs des plantes cultivées

Interfaces web


une interface web à destination des utilisateurs




Bases de données



Low cost platform technology with many applications





J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.015
17 / 02 / 2015

Contexte

- ❖ Introduction (JCS)
- ❖ Le contexte (JCS)
- ❖ Les projets en cours (JCS)
- ❖ Organisation du barcoding au CBGP (GG)
- ❖ Passage du Sanger au haut débit (PC)
- ❖ L'avenir du barcoding au CBGP (JCS)






J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.016
17 / 02 / 2015

Générer des séquences

Tomate Vigne CBGP- SMaCH Lycovitis	Arthropodes émergents CBGP Biofis
	Ceutho Colza CBGP- CETIOM ColeoTool
	Auxiliaires Lutte biologique CBGP-Sophia AuxiGen

- Programmes en cours depuis plus de deux ans
- Nouveaux programmes montés et financés depuis 2013




J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.017
17 / 02 / 2015

Générer des séquences

Tomate Vigne CBGP- SMaCH Lycovitis	Arthropodes émergents CBGP Biofis			
Aphididae A. Cœur d'acier	Ceutho Colza CBGP- CETIOM ColeoTool	Trichogramma CBGP Tricho-NG TriPTIC	Arthropodes Réunion CBGP/3P	
Agromyzidae M. Martinez R. Gil Ortiz	Auxiliaires Lutte biologique CBGP-Sophia AuxiGen	Phytoseidae M.S. Tixier Chalcidoidea G. Deivare A. Cruaud J.Y. Rasplus	Divers CBGP Tetranyques, Spodoptera, Ostrinia, Bemisia, Bruches etc.	Agro Pests CBGP LSV

- Séquences produites au CBGP depuis la découverte de la double hélice de Watson et Crick




J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.018
17 / 02 / 2015

Agréger des séquences

Tomate Vigne CBGP-SMaCH Lycovitis	Arthropodes émergents CBGP Biofis	Arthemis Base Arthropodes du CBGP		
Aphididae A. Cœur d'acier	Ceutho Colza CBGP-CETIOM ColeoTool	Trichogramma CBGP Tricho-NG TriPTIC	Arthropodes Réunion CBGP/3P	
Agromyzidae M. Martinez R. Gil Ortiz	Auxiliaires Lutte biologique CBGP-Sophia AuxiGen	Phytoseidae M.S. Tixier Chalcidoidea G. Delvare A. Cruaud J.Y. Rasplus	Divers CBGP Tetranyques, <i>Spodoptera</i> , <i>Ostrinia</i> , <i>Bemisia</i> , Bruches etc.	Agro Pests CBGP LSV


J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud
.019
17 / 02 / 2015

Biofis (2011-2015)

BIOagressors and invasive species: From Individual to population to Species


➤ **Trois axes** de recherches appliqués et académiques concernant les bioagresseurs et les espèces invasives (des cultures)


- Tâche 1/ identification/caractérisation
- Tâche 2/ mécanismes d'évolution/les processus démographiques
- Tâche 3/ gestion

Tâche 1: Niveau espèce (J.-Y. Rasplus + M.-S. Tixier)

→ identifier/caractériser les espèces actuellement/potentiellement invasives le plus rapidement possible après ou avant leur introduction + leurs ennemis naturels qui pourraient être utilisés dans des programmes de lutte biologique.


1000 espèces à séquencer d'ici fin 2015


J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud
.020
17 / 02 / 2015



AuxiGene (2013-2015)

Identification moléculaire d'auxiliaires des cultures



30 juin 2012
JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Texte 56 sur 202

matériel vivant à une autre structure) ou de l'exploitation commerciale du macro-organisme est notifié aux ministères chargés de l'agriculture et de l'environnement et à l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation.


Art. 3. – Lorsque la demande concerne un macro-organisme qui a déjà fait l'objet d'une évaluation officielle du risque phytosanitaire et environnemental dans un Etat dont les conditions agricoles, phytosanitaires, environnementales, notamment en termes de climat et de biodiversité, sont comparables au territoire pour lequel la demande est effectuée, les éléments de cette évaluation sont joints au dossier de demande.


Le dossier est rempli en faisant référence à cette évaluation pour les items où cela est pertinent.

Art. 4. – Afin de garantir l'identification taxonomique du macro-organisme concerné, toute demande d'autorisation fait l'objet, en complément des données fournies dans la partie I du dossier détaillé en annexe II du présent arrêté, d'un dépôt d'individus de référence auprès du centre de biologie et de gestion des populations (CBGP).

Art. 5. – Dans le cas d'une demande d'introduction dans l'environnement, un dossier spécifique est rempli pour chaque territoire envisagé d'introduction et pour chaque macro-organisme concerné défini au niveau de son espèce et de son territoire d'origine. Dans le cas d'un macro-organisme destiné à être commercialisé, le dossier est rempli également pour une référence commerciale donnée.


Dans le cas d'une demande d'entrée sur le territoire en milieu confiné sans introduction dans


J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud
.021
17 / 02 / 2015



AuxiGene

Identification moléculaire d'auxiliaires des cultures





Objectifs du projet :
 Créer un outil d'identification moléculaire des auxiliaires des cultures utilisées en lutte biologique. Barcoding multigénique (COI, ITS2).
 Développer une base de données iconographique et moléculaire.
 Créer une collection de référence (CBGP centre de dépôts des macro-organismes pour les Ministères de l'Agriculture et de l'environnement).

Animateurs :
 J.-C. Streito (INRA-CBGP Montpellier) – N. Ris (INRA-ISA, Sophia-Antipolis)

Financement : INRA – SPE (33 Keuros) (2013-2015)

200 espèces à séquencer


J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud
.022
17 / 02 / 2015




Coleotool


Identification moléculaire des charançons ravageurs des crucifères et de leurs parasitoïdes

Objectifs du projet :
 Créer un outil d'identification moléculaire des principaux charançons ravageurs des crucifères et de leurs auxiliaires parasitoïdes.
 Barcoding multigénique (COI, ITS2).
 Développer une base de données iconographique et moléculaire.
 Créer une collection de référence (CBGP et CETIOM). Transfert technologique au laboratoire du CETIOM.

Animateurs :
 J.-Y. Rasplus (INRA-CBGP) – G. Delvare (CIRAD-CBGP) - C. Robert (CETIOM)


Financement : CASDAR (285 K€ dont 70 CBGP) (2014-2017)






J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.023
17 / 02 / 2015




Lycovitis

Du diag
de diag



Budget :
 ■ 200 K€ sur 3 ans dont 33 pour le

Dpt	N° unité	Nom prénom	Rôle ou compétences
SPE	1290	Laval Valérie	Coordination, champignons pathogènes
SPE	1062	Streito Jean-Claude	Coordination, entomologie
SPE	1065	Blancard Dominique	Interfaces
SPE	1065	Armand Jean-Marc	Interfaces
EPPA	1202	Franc Alain	Outils d'assignation, bases de données
EPPA	1202	Chaumel Philippe	Outils d'assignation, bases de données
SPE	1345	LeSaux Marion	Bactériologie
SPE	1345	Portier Perrine	Bactériologie
SPE	1332	Candresse Thierry	Virologie
SPE	1332	Marais Armelle	Virologie
SPE	1332	Foissac Xavier	Phytoplasmes
SPE	1332	Danet Jean Luc	Phytoplasmes
SPE	1349	Grenier Eric	Nématologie
SPE	1355	Castagnone Philippe	Nématologie
SPE	1349	Fournet Sylvain	Nématologie
SPE	1355	Danchin Etienne	Nématologie
SPE	1355	Djian Caporalino Caroline	Nématologie
SPE	1349	Montarry Josselin	Nématologie
SPE	1355	Esmenjaud Daniel	Nématologie
SPE	1062	Pierre Eric	Entomologie, bases de données
SPE	1062	Gwenaelle Genson	Entomologie, BM
SPE	1062	Artige Emmanuelle	Entomologie, collections
SPE	1062	Cruaud Astrid	Entomologie, BM
SPE	1062	Rasplus Jean-Yves	Entomologie



J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud



Contexte


- ❖ Introduction (JCS)
- ❖ Le contexte (JCS)
- ❖ Les projets en cours (JCS)
- ❖ **Organisation du barcoding au CBGP (GG)**
- ❖ Passage du Sanger au haut débit (PC)
- ❖ L'avenir du barcoding au CBGP (JCS)



INRA
SCIENCE & IMPACT

J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.025
17 / 02 / 2015



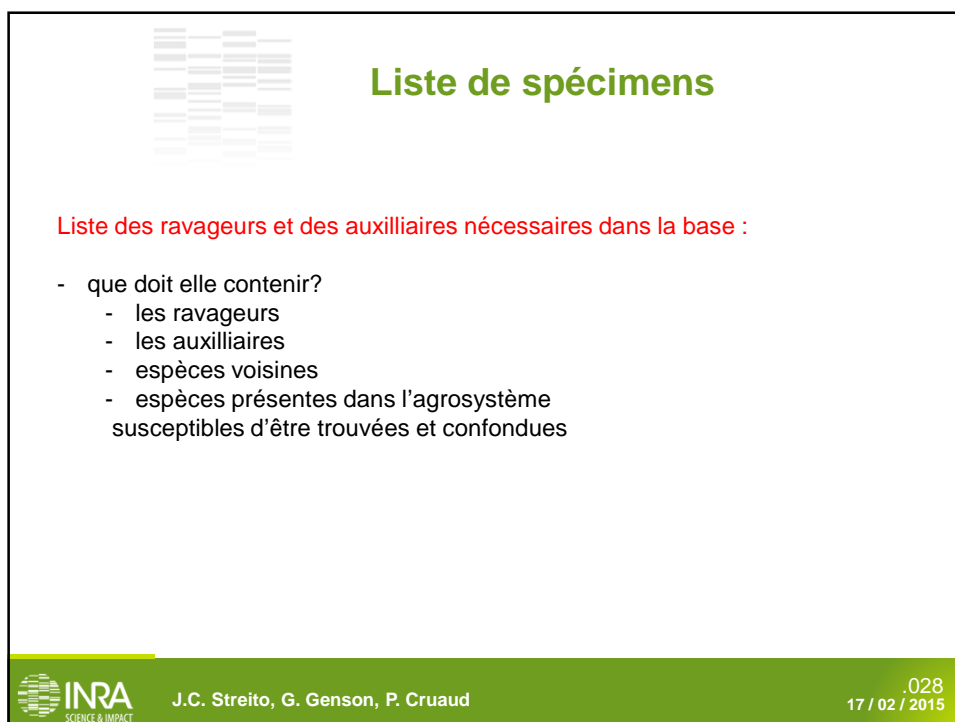
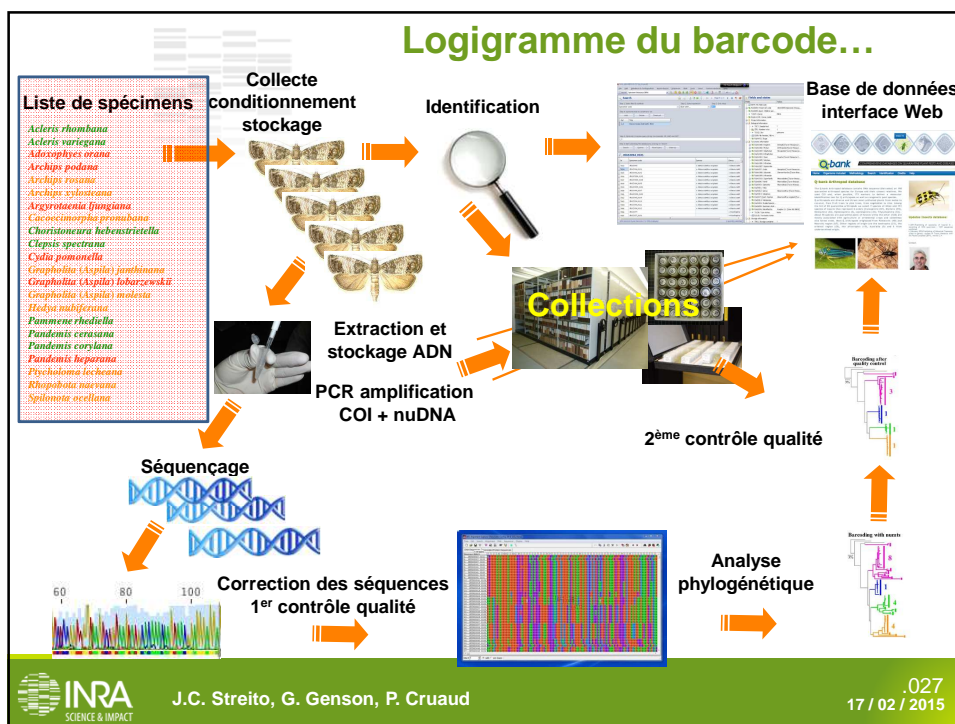
Organisation du barcoding au CBGP

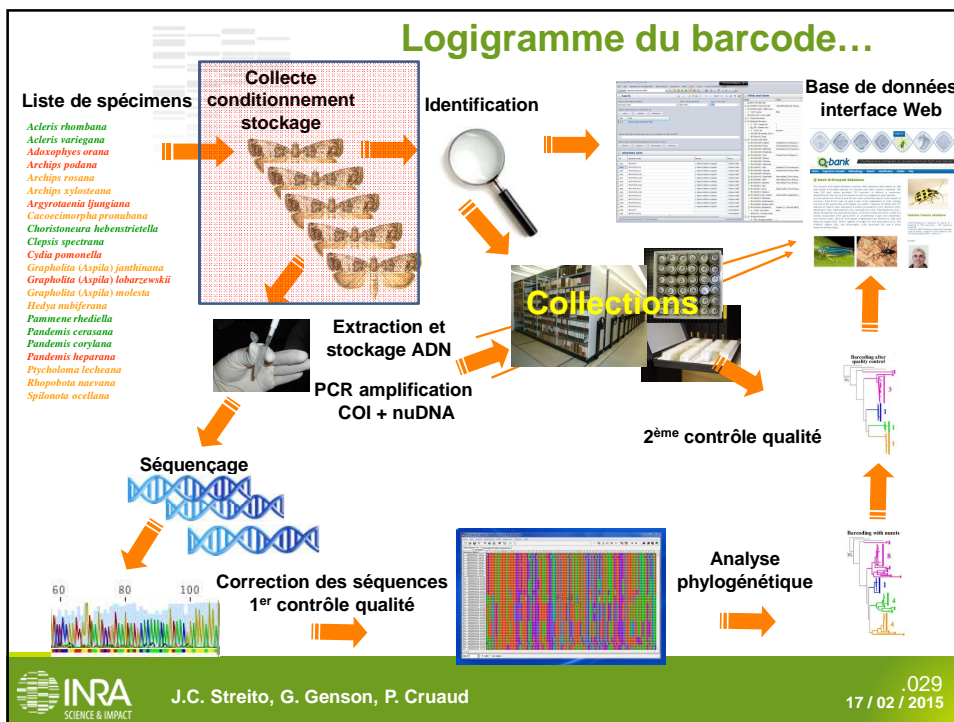
- ❖ **Organisation : collecte, identification, séquençage,
validation, archivage**
- ❖ **Personnel impliqué**

INRA
SCIENCE & IMPACT

J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.026
17 / 02 / 2015



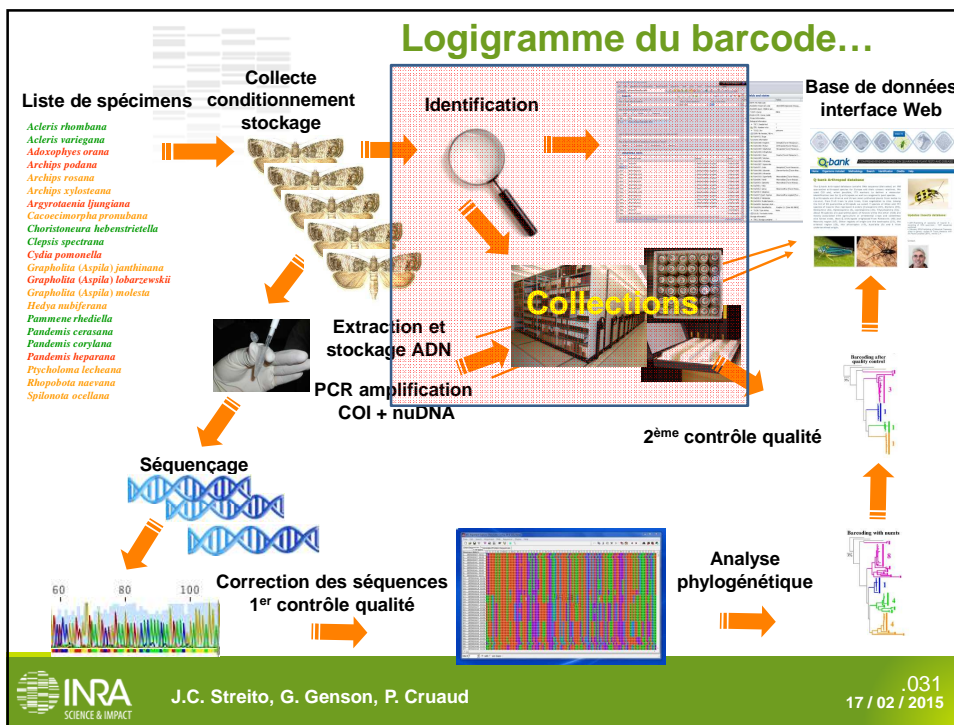


Dimension internationale de Lycovitis

Une mission organisée en Afrique du Sud

Université de Stellenbosch
Musée d'histoire naturelle IZICO
Professionnels et viticulteurs
Études des collections
Prélèvements d'échantillons

INRA SCIENCE & IMPACT
 J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud
 .030
 17 / 02 / 2015



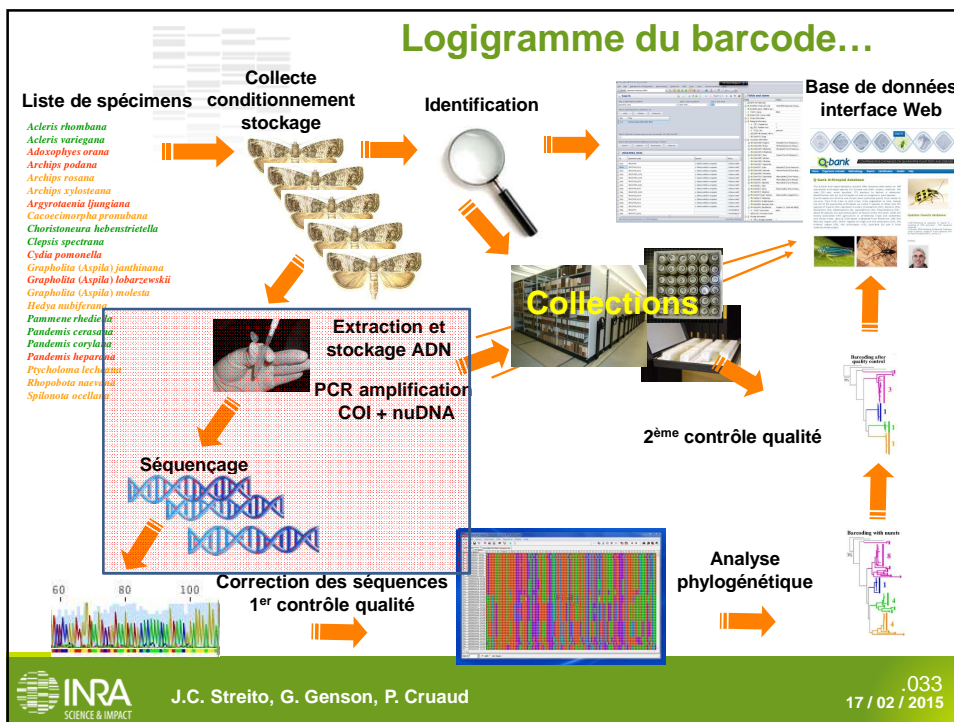
Identification

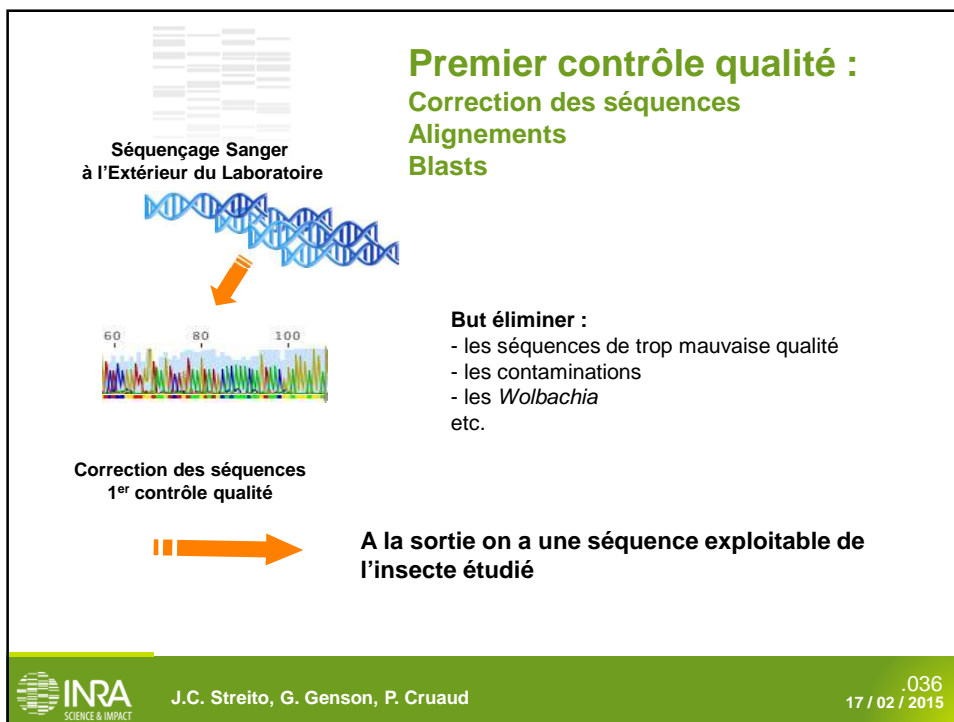
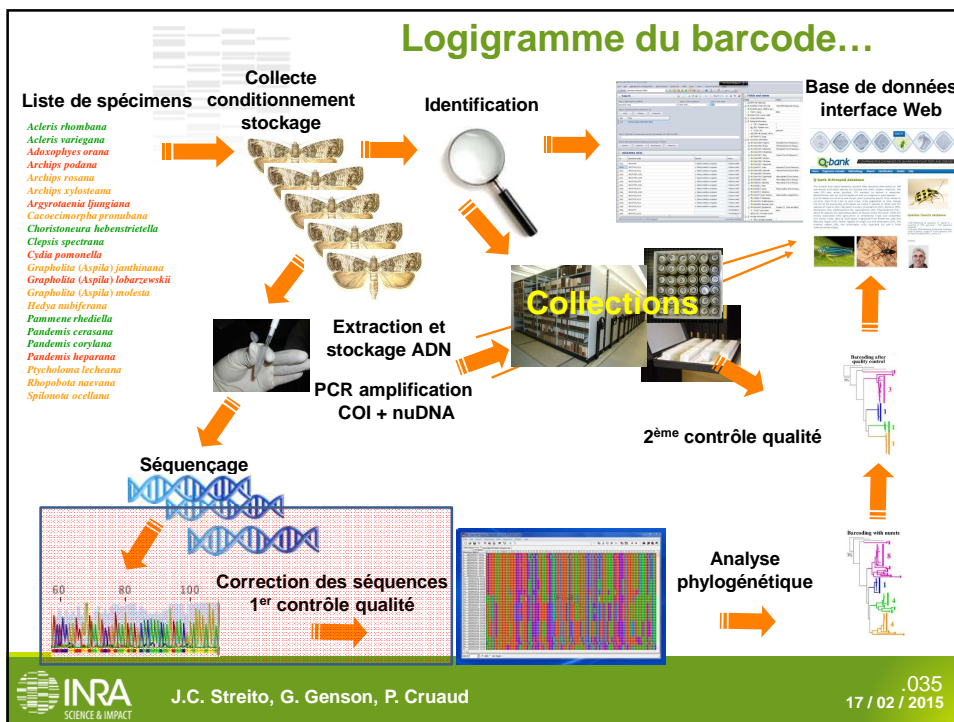
- Spécialistes – taxonomistes/systématiciens
- Collections
- Biblio

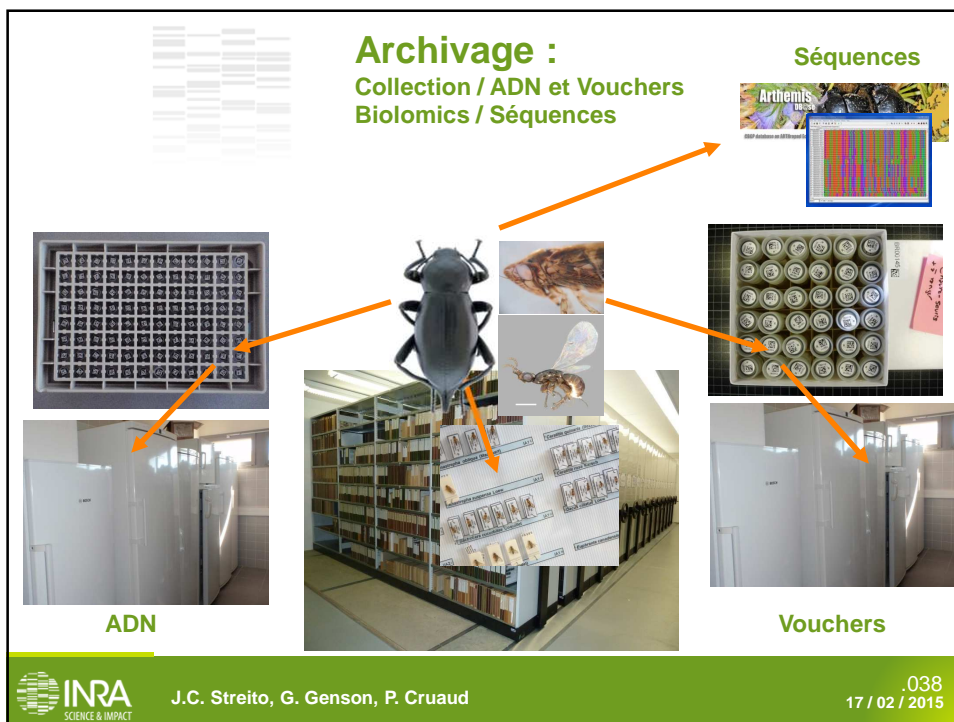
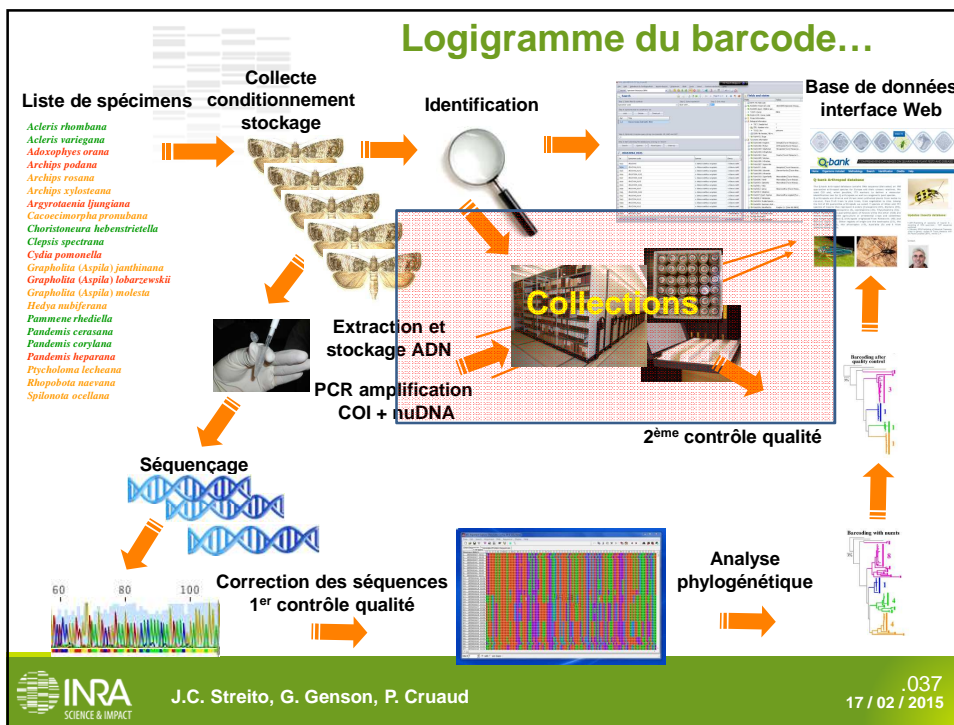
INRA SCIENCE & IMPACT

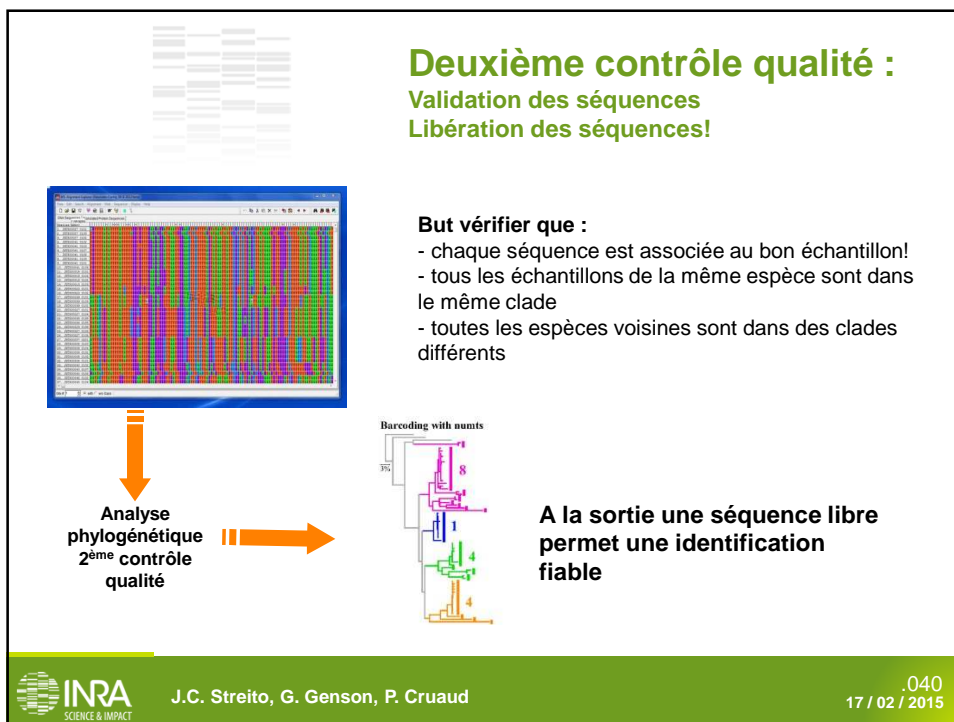
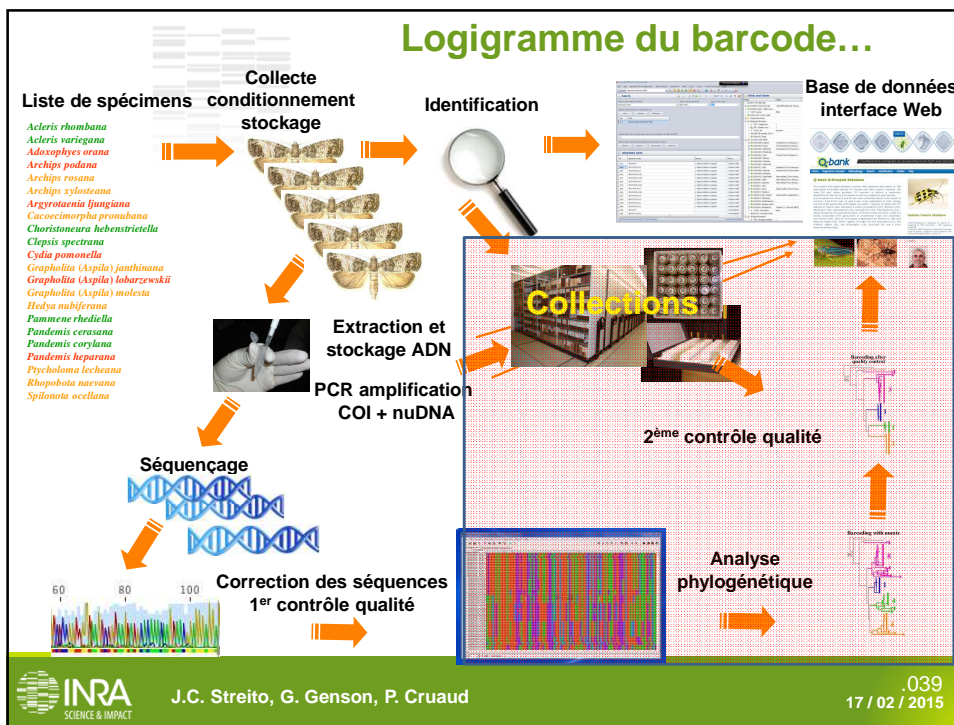
J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.032
17 / 02 / 2015



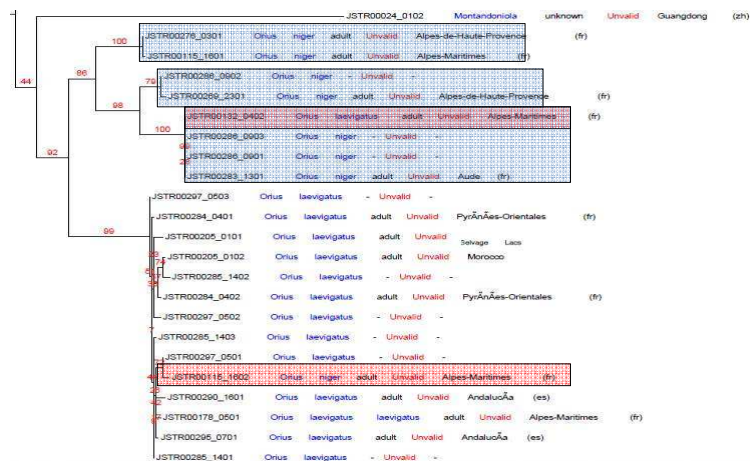






Validation of database

2nd quality control: phylogenetic analysis and sequences validation



Organisation du barcoding au CBGP

Mise en place :

- recherches de financements / appels d'offres / établissement des listes
- collecte
- extraction non destructive
- séquençage massif Sanger!
- procédures d'archivage des produits de l'ADN à la séquence en passant par le spécimen : plateforme collection et base de données Arthémis
- validation des séquences

Forces du CBGP :

- une plateforme collections
- une plateforme BM
- une base de données
- des taxonomistes terrain et labo

Personnel impliqué dans le barcoding

Ils ont des séquences!
 N. Gauthier, M. Navajas, A. Migeon, P. Auger, G. Kergoat, L. Soldati, M.P. Chapuis, N. Lemenager... S. Fellous, A. Estoup, D. Bourguet, R. Streiff, C. Kerdelhue...

Recherche de Projets :
 J.-Y. Rasplus
 A. Cruaud
 J.C. Streito

Bases de données interface web
Collection :
 E. Pierre
 E. Artige
 V. Robert

Collecte Identification Taxonomie :
 J-Y Rasplus, JC Streito, A Cruaud
 E. Pierre, C. Cocquempot
 G. Delvare
 A. Cœur d'Acier, M.S. Tixier, F.M. Gibon
 LSV

Extraction Amplification Séquencage
Gestion des séquences : G.Genson
NGS : P. Cruaud
 L. Benoit

Ils ont des projets de barcoding :
 A. Foucart, B. Michel, H.P. Aberlenc



INRA SCIENCE & IMPACT
 J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud
 .043
 17 / 02 / 2015

Arthemis

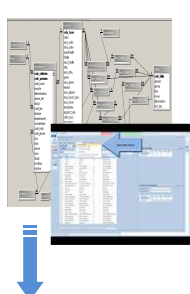


Héberge des données sur 6500 espèces, d'arthropodes, contient 20000 séquences et 800 photos.

Si on agrège nos données CBGP on arrivera sans doute à plus de 60000 séquences...

Projet d'héberger les données du 3P de la Réunion et des séquences d'Agroscope (Suisse).

Informations taxonomiques, biologiques et de distribution sur les espèces.
 Informations sur les spécimens, géolocalisation, hôtes et données moléculaires (séquences).

⇒ Production de plusieurs sites web, outils d'identification moléculaire de type BLAST => comparaison d'une séquence déposée au référentiel de barcodes => identification spécifique.

q-bank COMPRESSE DBASES CHIMANTIENNE RAFFINAGE COSEAS
<http://www.q-bank.eu/arthropods/>

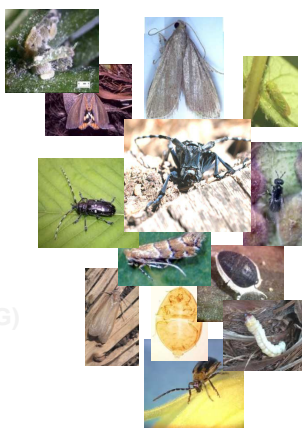
Arthemis DB@SE
 CBGP database on Arthropod Ecology, Molecular Identification and Systematics

PhylAphid DB@SE
 CBGP database on Aphid Ecology, Molecular Identification and Systematics

Insectes du Patrimoine Culturel
 Insectes dangereux pour les oeuvres patrimoniales
<http://aphiddb.supagro.inra.fr>

INRA SCIENCE & IMPACT
 J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud
 .044
 17 / 02 / 2015

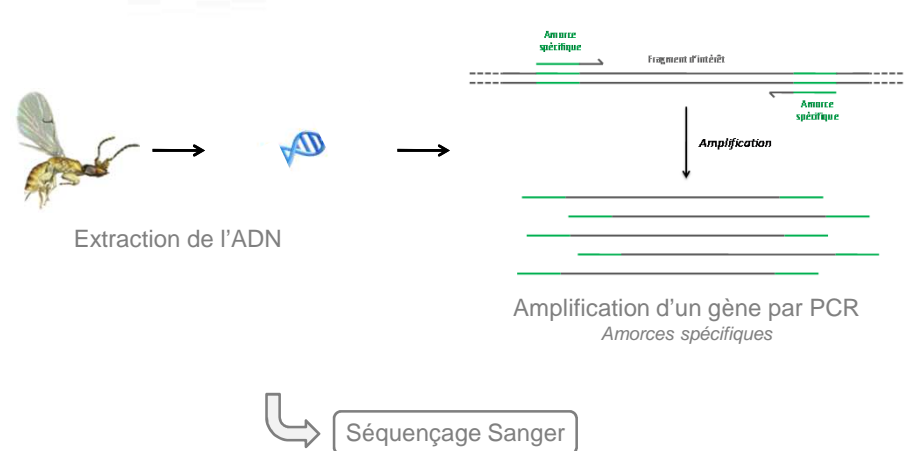
Contexte



- ❖ Introduction (JCS)
- ❖ Le contexte (JCS)
- ❖ Les projets en cours (JCS)
- ❖ Organisation du barcoding au CBGP (GG)
- ❖ **Passage du Sanger au Haut Débit (PC)**
- ❖ L'avenir du barcoding au CBGP (JCS)

.045
17 / 02 / 2015

Passage du Sanger...



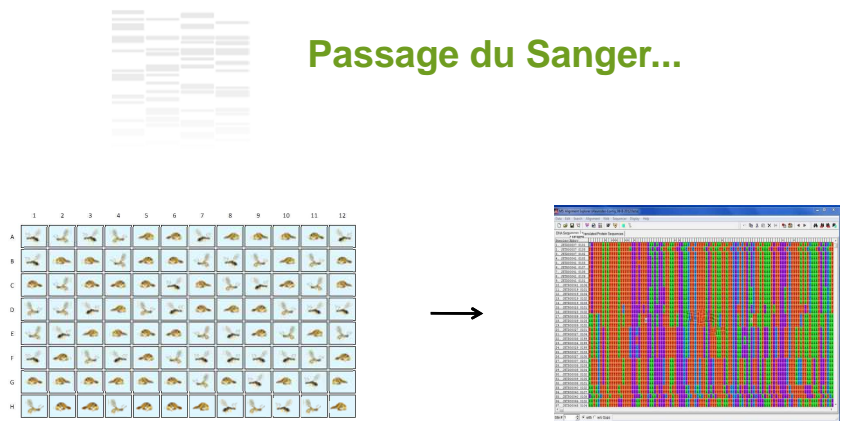
Extraction de l'ADN

Amplification d'un gène par PCR
Amorces spécifiques


Séquençage Sanger

.046

Passage du Sanger...



Obtention d'une séquence d'un gène par individu


 INRA
SCIENCE & IMPACT


.047

... au séquençage haut-débit

Ce que nous cherchons :

- ❖ Obtenir des résultats
 - sur plus d'individus,
 - sur plus de gènes différents,
 - plus rapidement,
 - et à moindre coût.



 INRA
SCIENCE & IMPACT

.048

... au séquençage haut-débit

Ce que nous sommes en train de faire

372 spécimens

Extraction de l'ADN

Amplification de 4 gènes différents par PCR, en 2 étapes

- Amplification du fragment d'intérêt
- Multiplexage

Mélange de tous les produits de PCR pour les 4 gènes et les 372 spécimens dans un seul tube

Séquençage haut-débit
Illumina MiSeq

❖ Coûts (372 spécimens, 4 gènes) :

- Séquençage classique Sanger → 12952 €
- Séquençage haut-débit → 7415 €

INRA
SCIENCE & IMPACT

.049

... au séquençage haut-débit

Ce que nous sommes en train de faire

Amplification de 4 gènes différents par PCR, en 2 étapes

- Amplification du fragment d'intérêt
- Multiplexage

Amorce séquençage Forward

Amorce spécifique Forward

Fragment d'intérêt

Amorce spécifique Reverse

Amorce séquençage Reverse

Amplification

Amorces utilisées

INRA
SCIENCE & IMPACT

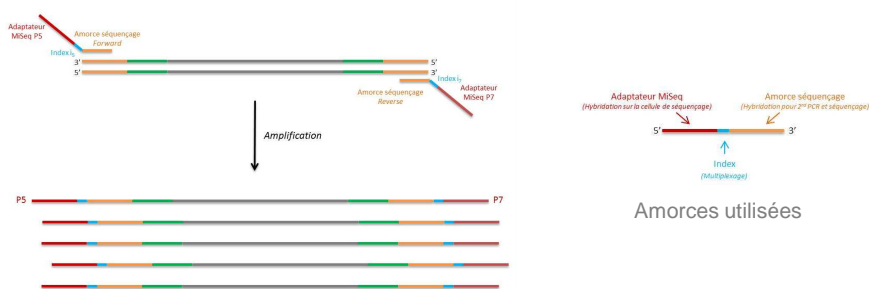
.050

... au séquençage haut-débit

Ce que nous sommes en train de faire

Amplification de 4 gènes différents par PCR, en 2 étapes

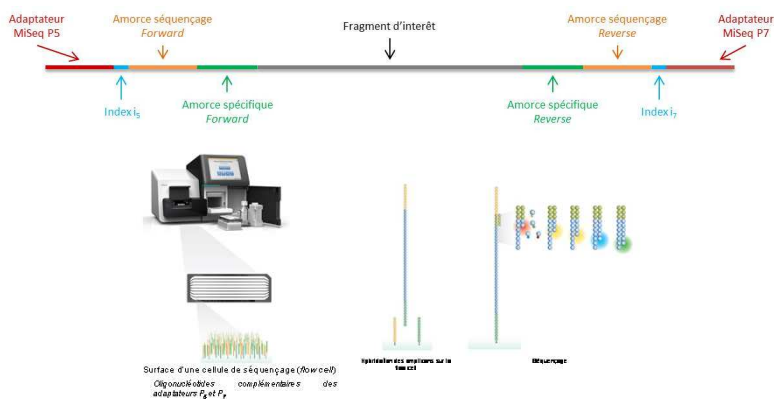
- Amplification du fragment d'intérêt
- Multiplexage




Intérêt de la PCR en 2 étapes : réutilisation des index indépendamment des amorces spécifiques

... au séquençage haut-débit

Ce que nous sommes en train de faire






... au séquençage haut-débit


Ce que nous sommes en train de faire

<div data-bbox="373 510 719 555" style="border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 2px; display: inline-block;">Méthode classique de Sanger</div>	<div data-bbox="898 510 1173 555" style="border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 2px; display: inline-block;">Séquençage haut-débit</div>
<p>Pour 96 individus, 96 séquences obtenues</p> <p><i>Traitement manuel des séquences</i></p>	<p>15 millions de séquences obtenues</p> <p><i>Traitement manuel impossible</i></p> <p><i>Mise en place d'un traitement automatisé</i></p>

→ Mise en place d'un traitement bio-informatique

- Nettoyage des séquences
- Réattribution des séquences à leur échantillon d'origine
- A terme, affiliation automatique des séquences obtenues


 INRA
SCIENCE & IMPACT .053




... au séquençage haut-débit


Ce que nous chercherons ensuite :

- ❖ Obtenir des résultats
 - sur toujours plus d'individus,
 - toujours plus différents,
 - sur toujours plus de gènes,
 - sur des mélanges complexes.


 INRA
SCIENCE & IMPACT .054



Barcoding au CBGP




- ❖ Introduction (JCS)
- ❖ Le contexte (JCS)
- ❖ Les projets en cours (JCS)
- ❖ Organisation du barcoding au CBGP (GG)
- ❖ Passage du Sanger au haut débit (PC)
- ❖ L'avenir du barcoding au CBGP (JCS)

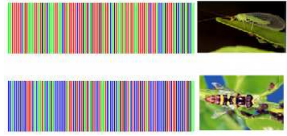


J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.055
17 / 02 / 2015




Code-barres



Le barcoding ouvre de nouvelles perspectives pour la protection des plantes :

- En terme de diagnostic
 - élimine les erreurs dues aux entomologistes,
 - identification fiable des stades pré imaginaires (œufs, larves, nymphes), assignation mâles/femelles...
 - détection des espèces cryptiques (peu différenciées)
 - unicité de la méthodologie moléculaire : une fois que la base de référence est réalisée, des non-spécialistes peuvent faire une identification
 - adaptée aux analyses de routines en grande série, alors moins coûteuse que l'identification morphologique.



J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.056
17 / 02 / 2015

Code-barres

Le barcoding ouvre de nouvelles perspectives pour la protection des plantes :

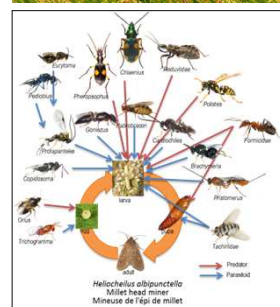
- Utilisation du séquençage haut débit

Pour l'épidémiologie :

- analyser le contenu d'un piège,
- flore totale d'un sol ou d'une feuille...
- mise au point de pièges automatiques...

Pour l'étude des agrosystèmes :

- analyse de contenus stomacaux,
- étude du parasitisme
- étude des microbiomes
- etc.



J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.057
17 / 02 / 2015

Code-barres

Le barcoding ouvre de nouvelles perspectives pour la protection des plantes :

- INRA et CBGP bien positionnés au niveau international,
- Volonté forte de SMACh de valoriser nos compétences à l'international,
- Dépôts de deux déclarations d'intention : H2020 et Endure,
- Vers le montage de projets européens pluridisciplinaires.



J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.058
17 / 02 / 2015

Merci !



J.C. Streito, G. Genson, P. Cruaud

.059
17 / 02 / 2015