

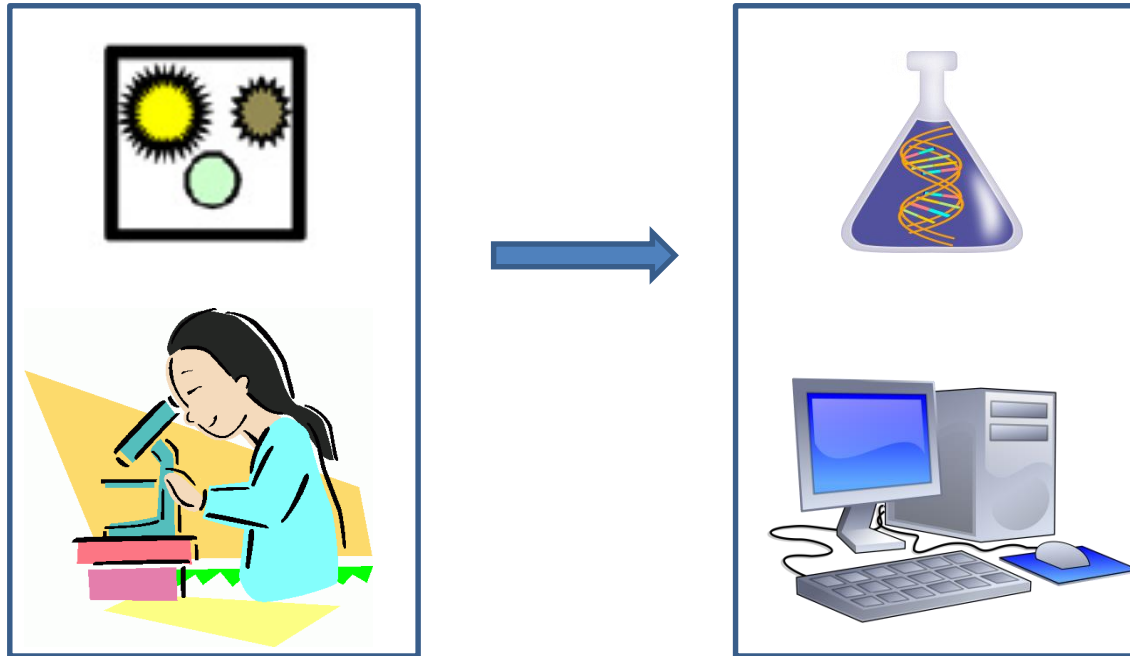
---

# Développement de méthodes de biologie moléculaire pour la lecture des lames : avantages et inconvénients par rapport à une lecture optique

Marie Laure Desprez Loustau & Emilie Chancerel

# Principe

Remplacer l'identification des pollens ou spores (assignation à un taxon : espèce/genre/famille) sur des critères optiques (morphologie) par une identification moléculaire



# Critères d'une bonne méthode d'analyse des captures

---

Identification des espèces allergènes : toutes et seulement elles  
spécificité – sensibilité

Quantification / sensibilité

Rapidité / « temps réel »

Equipement

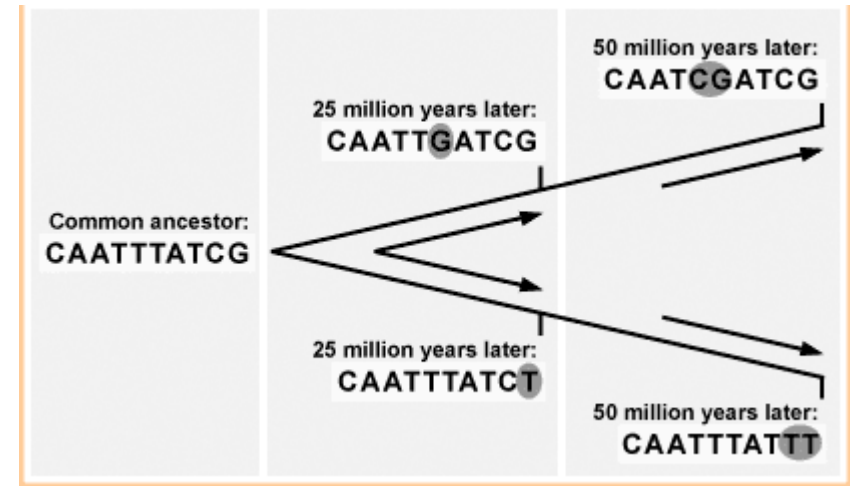
Expertise

Coût

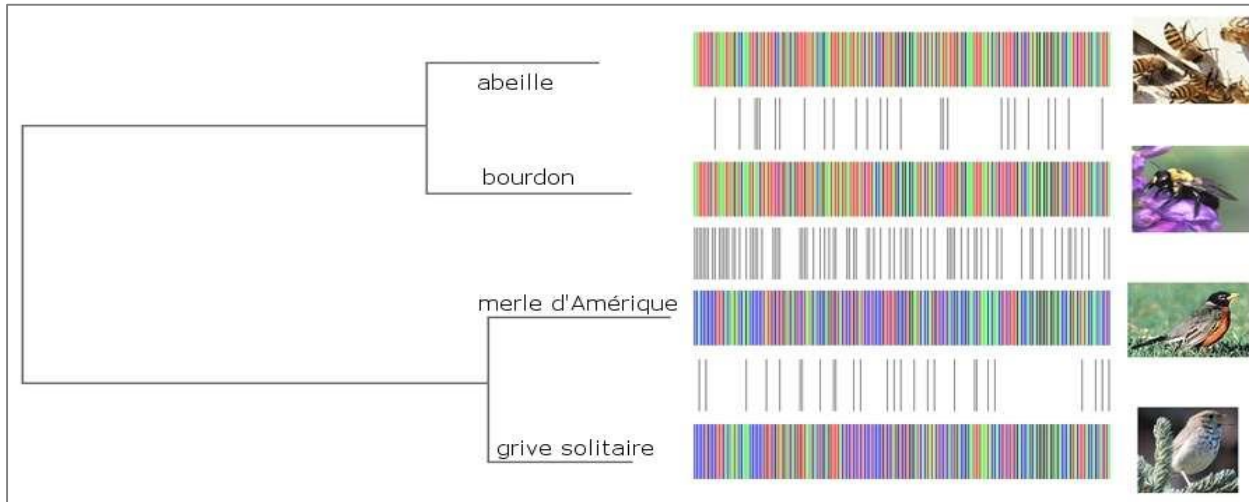
# Identification moléculaire

## Identification des espèces allergènes : toutes et seulement elles spécificité – sensibilité

- Chaque **individu** (plante, animal, homme...) a une séquence d'ADN unique
- Plus l'ancêtre commun de 2 individus est éloigné, plus les différences entre séquences vont être importantes => possibilité de différencier espèces, genres, familles...
- MAIS, les méthodes actuelles de séquençage de masse ne permettent de séquencer que quelques centaines de paires de bases (génomés entiers = centaines de millions de nucléotides)



# Code-barre ADN



© Herbert *et al.* 2004, *Plos Biology*

The screenshot shows the BioEdit Sequence Alignment Editor interface. The menu bar includes File, Edit, Sequence, Alignment, View, Accessory Application, RNA, World Wide Web, Options, Window, and Help. The toolbar contains various editing tools. The main window displays three sequences aligned:

- Ambrosia artemisiifolia
- ambrosia trifida
- Baccharis hamilifolia

The alignment is shown as a grid of characters (A, C, G, T) and dots representing gaps. A ruler at the bottom indicates sequence positions from 10 to 110.

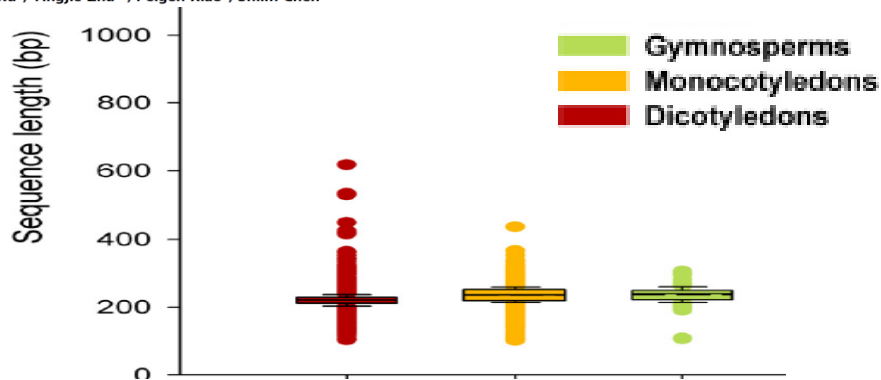
# Résolution taxonomique

OPEN ACCESS Freely available online

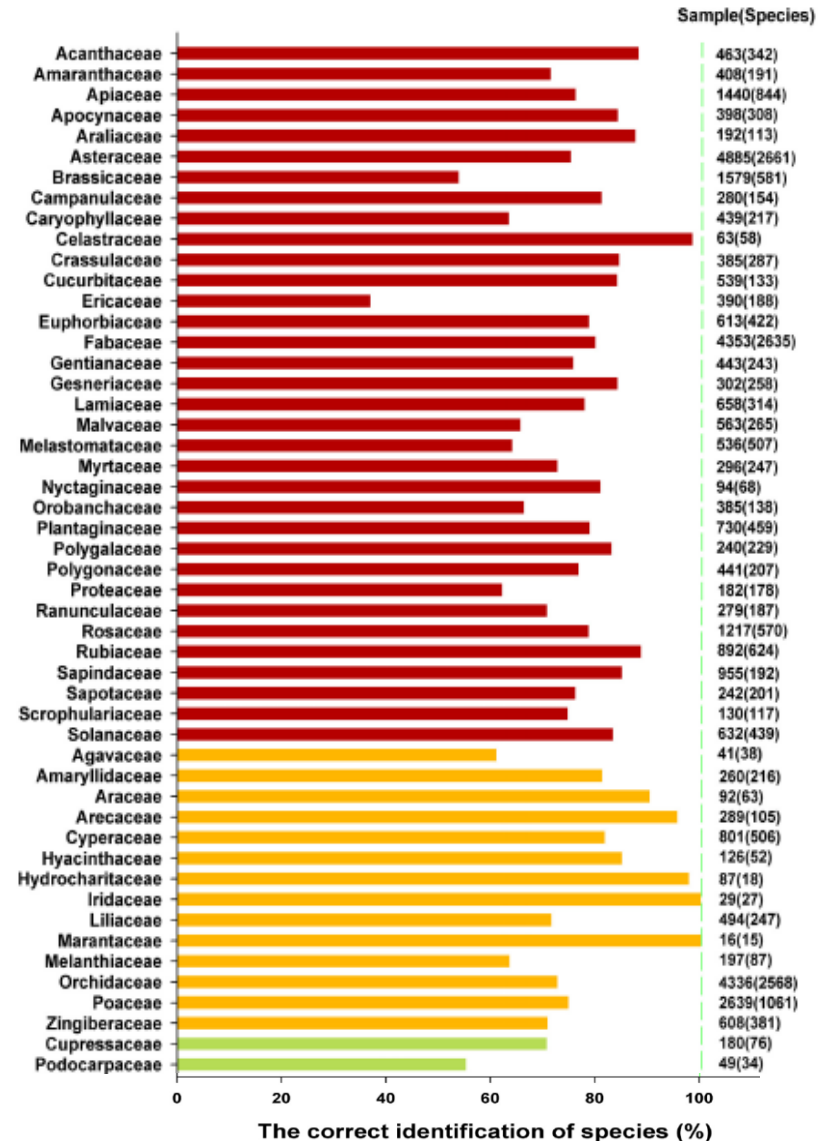
PLoS one

## Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals

Hui Yao<sup>1\*</sup>, Jingyuan Song<sup>1\*</sup>, Chang Liu<sup>1\*</sup>, Kun Luo<sup>1,2</sup>, Jianping Han<sup>1</sup>, Ying Li<sup>1</sup>, Xiaohui Pang<sup>1</sup>, Hongxi Xu<sup>4</sup>, Yingjie Zhu<sup>2\*</sup>, Peigen Xiao<sup>1</sup>, Shilin Chen<sup>1\*</sup>



Taxa	Taxa level	Correct identification (%)
Dicotyledons	Species	76.1
	Genus	99.1
Monocotyledons	Species	74.2
	Genus	97.9
Gymnosperms	Species	67.1
	Genus	99.5

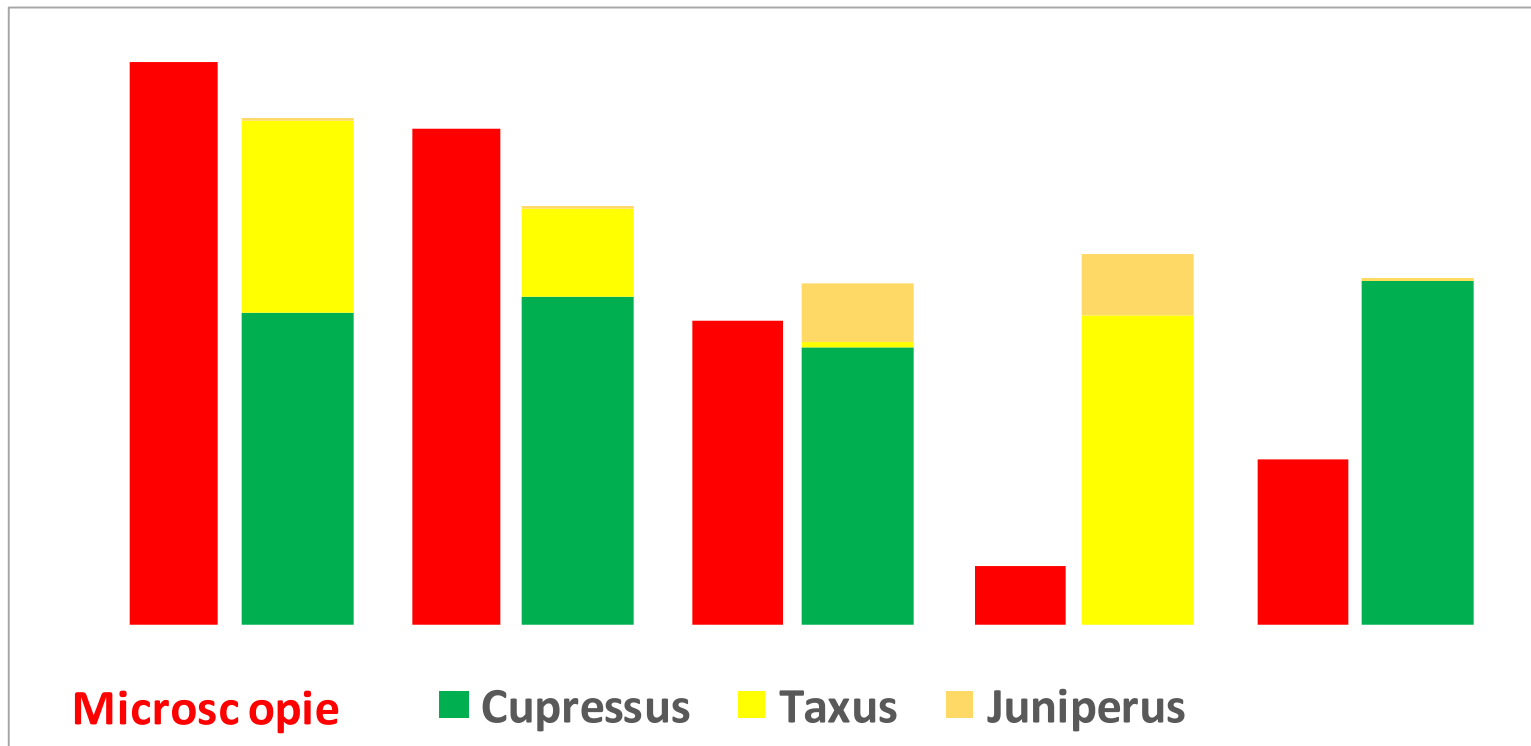




# Résultats obtenus

7 lames de Bordeaux 2016 (mars-mai) comparées pour comptages en microscopie et séquençage avec le marqueur cytoplasmique trnL (blast « best hit » sur base de séquences de référence)

- Tous les taxons identifiés au microscope l'ont été par ADN (quand présents dans la base)
- Plus forte résolution moléculaire en général





# Base de séquences de référence (plantes allergènes)

Arbres			
Espèces	Famille	Potentiel allergisant	
Érables*	Acéracées	Modéré	Acer campestre, monspessulanum, pseudoplatanus
Aulnes*	Bétulacées	Fort	Alnus glutinosa
Bouleaux*		Fort	Betula alba
Charmes*		Fort	Carpinus betulus
Charme-Houblon		Faible/Négligeable	
Noisetiers*		Fort	Corylus avellana
Baccharis	Composées	Modéré	Baccharis halimifolia
Cade	Cupressacées	Fort	
Cyprés commun		Fort	Cupressus
Cyprés d'Arizona		Fort	Cupressus arizonica
Genévrier		Faible/Négligeable	Juniperus communis
Thuyas*		Faible/Négligeable	Thuja orientalis
Robiniers*	Fabacées	Faible/Négligeable	
Châtaigniers*	Fagacées	Faible/Négligeable	
Hêtres*		Modéré	Fagus sylvatica
Chênes*		Modéré	Quercus ilex, petraea, pubescens, robur, rubra, suber, coccoifera, pyrenaica
Noyers*	Juglandacées	Faible/Négligeable	
Mûrier à papier*	Moracées	Fort	Broussonetia papyrifera
Mûrier blanc*		Faible/Négligeable	
Frênes*	Oléacées	Fort	Fraxinus excelsior
Olivier		Fort	Olea europea
Troènes*		Modéré	Ligustrum vulgare
Pins*	Pinacées	Faible/Négligeable	
Platanes**	Platanacées	Modéré**	Platanus acerifolia
Peupliers*	Salicacées	Faible/Négligeable	
Saules*		Modéré	Salix alba, fragilis, viminalis
If*		Taxacées	Faible/Négligeable
Cryptoméridia du	Taxodiacées	Fort	Cryptomeria japonica
Tilleuls*	Tiliacées	Modéré	Tilia cordata, platyphyllos
Ormes*	Ulmacées	Faible/Négligeable	Ulmus campestris
			Sambucus nigra

Herbacées spontanées			
Espèces	Familles	Potentiel allergisant	
Chénopodes*	Chénopodiacées	Modéré	Chenopodium album
Soude brûlée (Salsola kali)		Modéré	
Ambrosies*	Composées	Fort	Ambrosie
Armoises*		Fort	Artemisia verlotorum, vulgaris
Marguerites*		Faible/Négligeable	
Pissenlits*		Faible/Négligeable	
Mercuriales*	Euphorbiacées	Modéré	Mercurialis perenne
Plantains*	Plantaginacées	Modéré	Plantago lanceolata, major
Graminées	Poacées	Fort	Agrostis capillaris, stolonifera, Alopecurus pratensis, Dactylis glomerata, Anthoxanthum odoratum, Avena sulcata, Brachypodium sylvaticum, Bromus commutatus, Cynodon dactylon, Cynosurus cristatus, Gaudinia fragilis, Holcus lanatus, Hordeum secalinum, Lolium perenne, Phléole, Poa trivialis, Triticum sativum
Oseilles* (Rumex)	Polygonacées	Modéré	
Orties*	Urticacées	Faible/Négligeable	Urtica dioica
Pariétaires		Fort	Pariétaire
Graminées Ornementales			
Espèces	Familles	Potentiel allergisant	
Baldingère	Poacées	Fort	Phalaris arundinacea
Calamagrostis		Modéré	
Canche sespitéuse		Fort	
Elyme des sables		Modéré	
Fétuques*		Fort	Festuca arundinacea
Fromental élevé		Fort	Arrhenatherum elatius
Queue de lièvre		Modéré	Lagurus ovatus
Stipe géante		Modéré	Stipa gigantea

Collaborations

Didier Alard (Univ Bordeaux)

Collection Villa Thuret (INRA Antibes), Jardin botanique de Bordeaux

Bruno Chauvel (INRA Dijon)

# Aspects pratiques

---

Rapidité	5 jours	(1 j extraction ADN	+	4 j séquençage)
	100 lames	hors transport		
Coût	< 3000€	300?		2300 €

Equipement (nouveaux capteurs)  
labo extraction RNSA?  
séquençage externalisé sur plate-forme génomique

Expertise externalisée  
en amont des analyses  
(base de données: taxonomie <-> séquences)

# Conclusion

	Morphologie (optique)	ADN
SPECIFICITE	+	++ POLLEN et MOISSURES
SENSIBILITE	+	++ (amplification ADN + toute la lame)
RAPIDITE	-	- (devrait s'améliorer)
FAISABILITE (inverse COUT)	- (temps de travail)	- ~ 4 ETP pour 50 * 100 échantillons
PERSONNEL / ORGANISATION	Expertise et analyses internalisées et décentralisées	Expertise et analyses externalisées et centralisées (nécessité de regrouper toutes les échantillons)

- **Poursuite de la base de données** de séquences de référence pour les espèces à pollen allergène et espèces proches  
Amélioration des méthodes d'assignation
- Vers des données en **temps réel** :  
nouvelles méthodes de séquençage?
- **Comparer en conditions réelles**  
méthode standard –  
méthode optique automatisée –  
méthode moléculaire?
- Utilisation des captures du RNSA pour **surveillance des champignons** pathogènes forestiers

