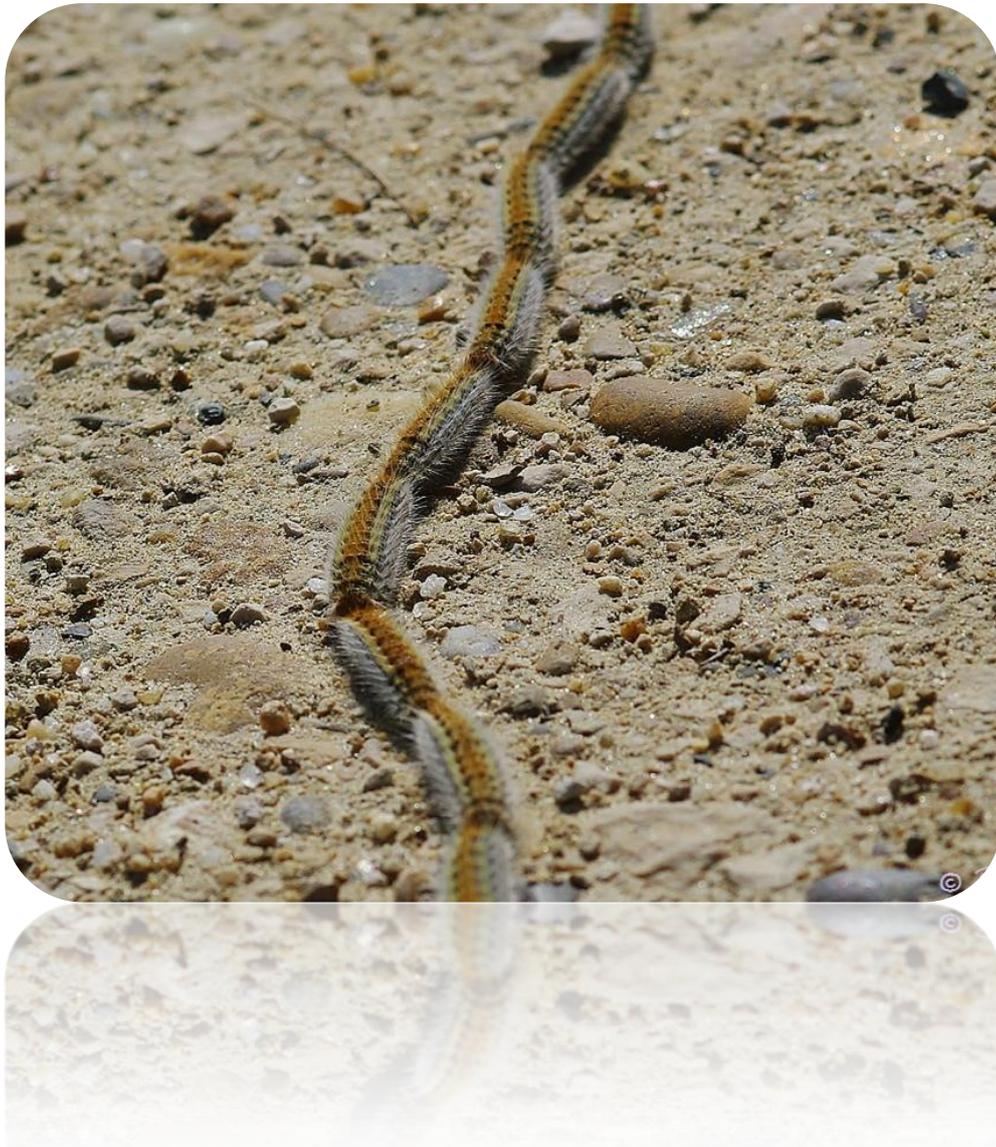


BOURGEOIS Thomas
BTS Biotechnologies – 1^{ère} année
Stage effectué du 29 mai au 20 juillet 2012

Lycée Jacques MONOD
7, Rue Léon BLUM
B.P. 80159
45803 Saint-Jean-de-Braye Cedex

Maitre de stage : Jérôme ROUSSELET



ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE DE LA PROCESSIONNAIRE DU PIN DANS LES BALKANS



Institut National de la Recherche Agronomique
Unité de recherche de Zoologie Forestière
2163 Avenue de la Pomme de Pin
CS 40001 Ardon
45075 Orléans Cedex 2

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
ABREVIATIONS.....	3
GLOSSAIRE	4
PARTIE 1 - L'ENTREPRISE	5
I. L'INRA.....	6
II. Le centre d'Orléans.....	6
III. L'Unité de Recherche de Zoologie Forestière	7
PARTIE 2 - LE SUJET DE RECHERCHE	9
I. Introduction	10
II. Généralités.....	12
A. Le matériel biologique : <i>Thaumetopoea pityocampa</i>	12
1. Biologie Animale.....	12
2. Différents impacts de la processionnaire	12
3. Méthodes de lutte employées	12
III. Matériel et Méthodes	13
A. Les Codes-barres et la Gestion des Echantillons.....	14
B. L'extraction d'ADN	14
C. L'amplification de l'ADN par PCR	15
D. Réactions et précipitations de séquences	16
E. Analyse des réactions de séquences.....	16
F. Analyse des données.....	17
IV. Résultats expérimentaux.....	17
A. Comparaison des kits	17
B. Analyse des séquences	18
V. Conclusions.....	20
A. Conclusion scientifique	20
B. Conclusion personnelle.....	20
ANNEXES	21
ANNEXE 1 – PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN A PARTIR DE TISSUS CELLULAIRES	22
ANNEXE 2 – PROTOCOLE DE PCR A PARTIR D'UNE EXTRACTION D'ADN	23
ANNEXE 3 – PROTOCOLE DE REACTION DE SEQUENCE	23
ANNEXE 4 – SEQUENCE DES AMORCES UTILISEES	24
ANNEXE 5 – PROTOCOLE DE PRECIPITATION DE SEQUENCE	24
ANNEXE 5 – METHODE DE SANGER	25
ANNEXE 7 – SEQUENCE DE BASES AZOTEES	26
ANNEXE 8 – SEQUENCE AVEC ERREURS	27
ANNEXE 9 - ABSORBANCE D'UNE EXTRACTION AVEC CHAQUE KIT	28

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu Alain ROQUES, Directeur de l'Unité de Zoologie Forestière, qui m'a permis d'effectuer mon stage au sein de son unité.

Puis je remercie évidemment Jérôme ROUSSELET, Chercheur à l'URZF, qui m'a permis de faire une petite partie de ce projet sous sa direction. Je le remercie également pour sa patience et sa compréhension. Je le remercie aussi pour sa confiance, ses explications et son aide pour rédiger ce rapport.

Je remercie Emmanuelle MAGNOUX, Assistante Ingénieur, qui m'a formé aux manipulations et à l'utilisation du matériel.

Je remercie aussi Claudine COURTIN, Technicienne de Recherche, qui m'a encadré lors de ma présence en laboratoire, et pour son aide précieuse.

Enfin, je remercie toute l'Unité, pour sa bonne humeur, son accueil, et sa disponibilité lorsque j'en ai eu besoin, et qui m'a fait apprécier ce stage.

ABREVIATIONS

% : Pourcent

μL : microlitre

ADN : Acide Désoxiribo-Nucléique

AERES : Agence d'Evaluation de la Recherche et le l'Enseignement Supérieur

AGPF : Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières

BTK : Bacillus thuringiensis Kurstaki

COI : Cytochrome Oxidase I

ddNTP : didésoxynucléotide triphosphate

dNTP : désoxynucléotide triphosphate

GBFor : Génétique et Biomasse Forestières

H₂O : Eau

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IUPAC : *International Union of Pure and Applied Chemistry* (Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée).

mL : millilitre

mM : millimolaire (mmol.L-1)

mmol : millimole

pb : paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

qsp : Quantité suffisante pour

Taq : Thermus aquaticus

UE : Unité Expérimentale

UR : Unité de recherche

URZF : Unité de Recherche en Zoologie Forestière

GLOSSAIRE

ADN polymérase : Enzyme servant à la réplication de l'ADN.

Amorce : Fragment d'ADN monocaténaire complémentaire avec l'une des extrémités de la séquence cible d'ADN à amplifier et servant de point de départ à une ADN polymérase.

Chitine : polymère de sucres, composante majeur de la cuticule formant l'exosquelette des insectes.

Haplogroupe : Regroupement de plusieurs haplotypes mitochondriaux.

Haplotype : Séquence génomique située sur un chromosome.

Hotspot : Zone de refuge d'un nombre important d'espèces durant une aire glaciaire.

Locus : Zone précise et délimitée sur une séquence d'un chromosome servant généralement de base à une identification.

Palynologie : Etude des spores et grains de pollen.

Phyllophage : Qui se nourrit de feuillage.

Phylogéographie : Etude des lignées généalogiques, leur processus, leur distribution.

Qsp : « Quantité suffisante pour », quantité nécessaire pour atteindre un volume donné.

Séquence : Succession de bases nucléotidiques constitutives de l'ADN.

Taq polymérase : ADN polymérase thermorésistante intervenant dans la réplication de l'ADN et utilisée lors d'une intense chaleur. Cette enzyme a un faible taux d'erreur (1 sur un million de paires de bases), ce qui permet de l'utiliser pour le séquençage.

Tubes de Malpighi : Tubes jouant, chez les Insectes, un rôle dans l'appareil excréteur en filtrant les déchets azotés, l'acide urique et les sels minéraux en excès. Ils jouent également un rôle dans l'osmorégulation en extrayant le potassium de l'eau utilisée, la rendant ainsi réutilisable.

PARTIE 1

L'ENTREPRISE

I. L'INRA

Historique

1921 : Création de l'Institut de Recherches Agronomiques (IRA) organisé par disciplines scientifiques et par centre de recherche à vocation régionale.

1924 : L'institut s'installe à Versailles sous le nom de CNRA (Centre National de Recherche Agronomique).

Les centres suivants sont ceux de Versailles (centre national), Antibes, Bordeaux, Clermont-Ferrand, Colmar et Montpellier (centres régionaux).

1946 : Création de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'après la loi du 18 mai.

Il s'agit d'un Etablissement Public Administratif placé sous l'autorité du Ministère chargé de l'Agriculture, qui organise, exécute, et publie les travaux de recherche relatifs à l'amélioration et au développement des productions végétales et animales. Il transforme et conserve les produits agricoles.

1984 : Transformation de l'INRA en Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique (EPST), géré par les Ministères de la Recherche et de l'Agriculture.

Aujourd'hui : L'INRA est un organisme qui apparait deuxième au niveau mondial et premier au niveau européen en terme de productions et publications sur la recherche agronomique.

L'INRA est désormais présent dans 16 régions de France.

II. Le centre d'Orléans

Le centre de recherche d'Orléans est composé de 6 unités :

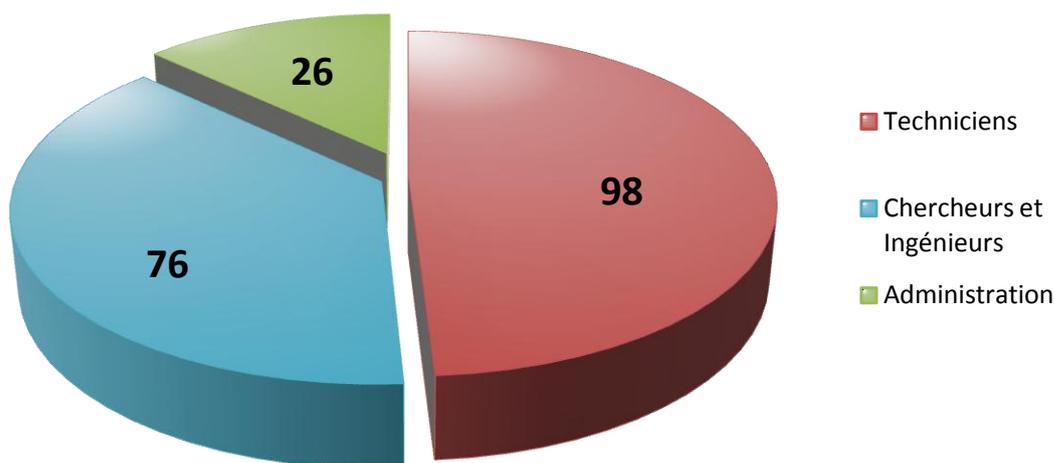
- **3 unités de recherche** (UR AGPF, UR ZF et UR Science du sol)
- **1 unité de service** (US Infosol)
- **2 unités expérimentales** (UE GBFor et UE Bourges)

3 départements de recherche sont représentés :

- Ecologie, Prairie et Milieux Aquatiques
- Environnement et Agronomie
- Génétique Animale

Les effectifs du centre d'Orléans

Le centre d'Orléans emploie 200 personnes réparties de la manière suivante :

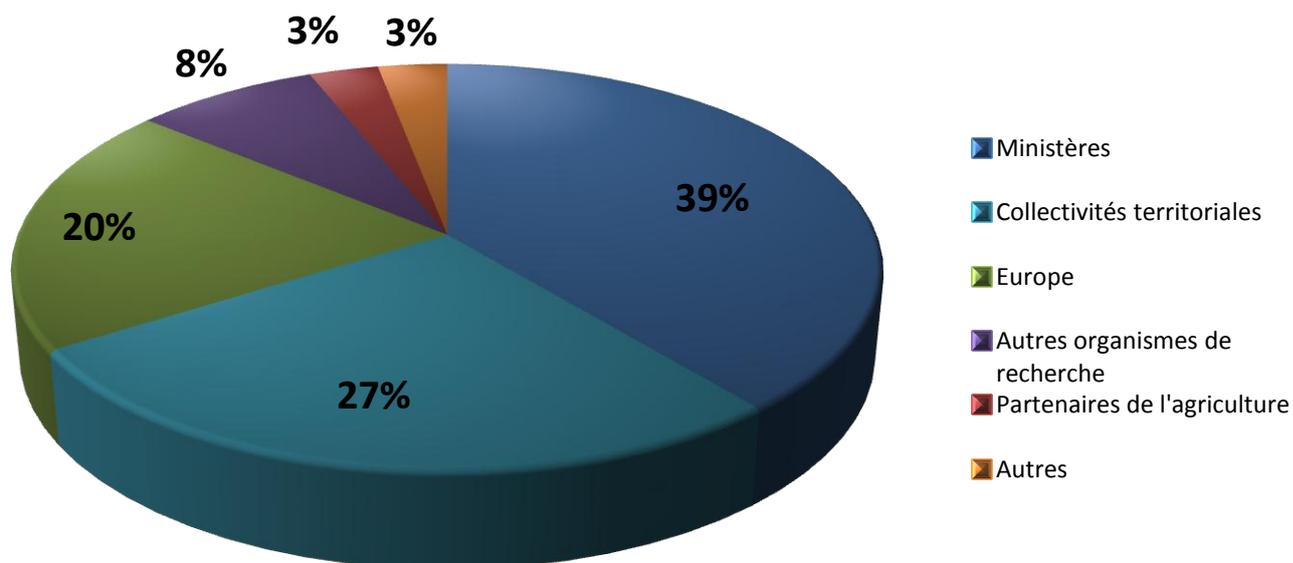


Effectifs de l'INRA d'Orléans

De plus, l'INRA d'Orléans accueille une cinquantaine de non-titulaires, comme par exemple des étudiants, doctorants, post-doctorants, et chercheurs étrangers.

Les moyens financiers

La somme des moyens budgétaires de l'INRA, s'élevant à 5,9 millions d'euros, est issue de diverses sources. Ainsi, la répartition de ces ressources financières est disposée de façon suivante :



Moyens budgétaires

III. L'Unité de Recherche de Zoologie Forestière

L'unité de Zoologie Forestière a plus une vocation de pôle d'entomologie que de biologie animale générale. En effet, elle a pour but de comprendre les mécanismes qui motivent les populations d'insectes. Les deux principales thématiques de l'unité sont par ailleurs intitulées « Populations en expansion avec le changement climatique » et « Invasions biologiques ».

Les recherches au sein de l'unité ont tant une vocation de prévention envers certaines espèces, comme par exemple la Processionnaire du pin, que de protection, comme pour l'Isabelle de France, une espèce menacée d'extinction.

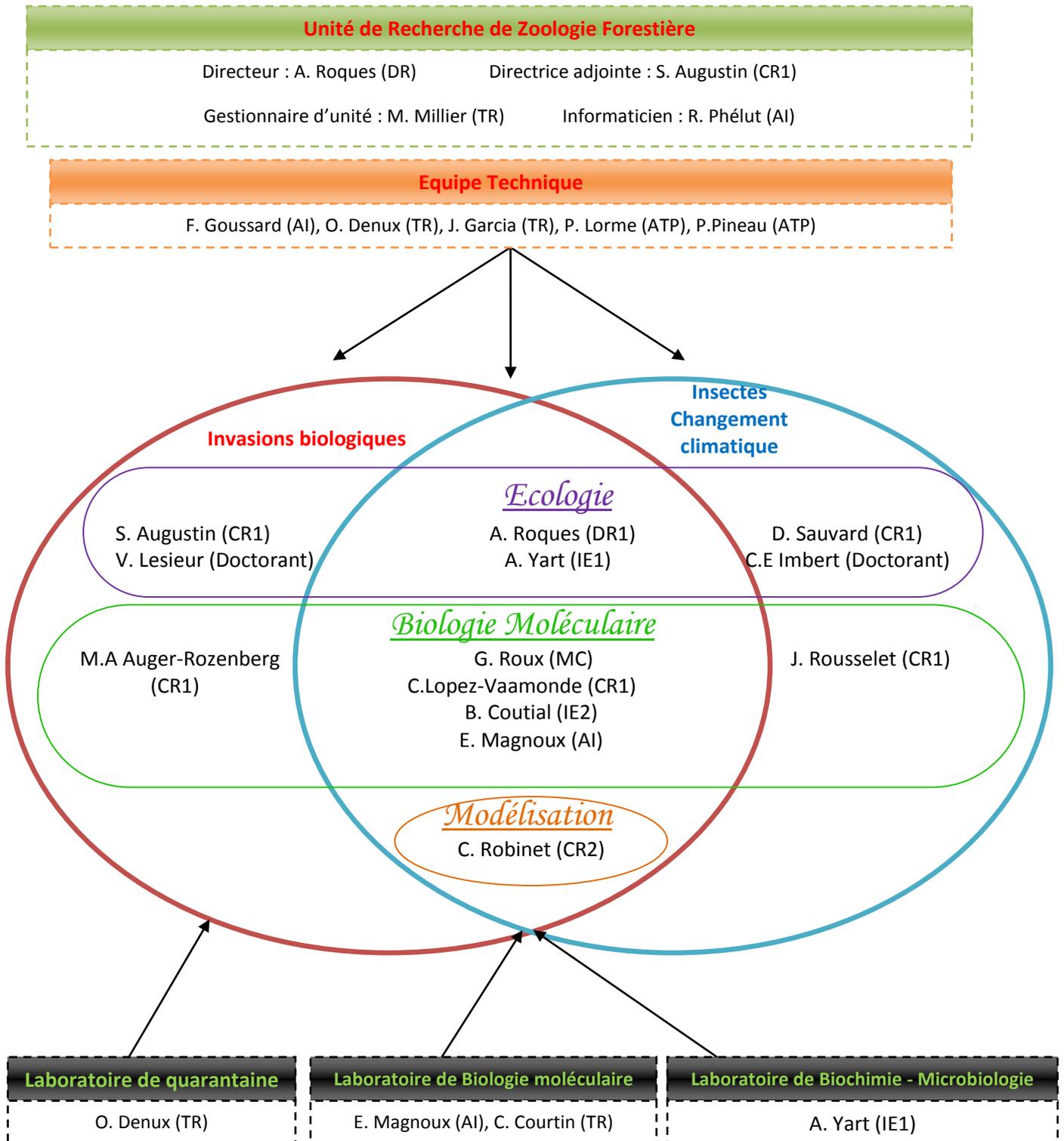
Par conséquent, plusieurs actions ont été effectuées. Un inventaire des espèces exotiques d'insectes présents en Europe a été créé, permettant d'identifier les risques et l'origine des espèces invasives. La phéromone sexuelle de l'Isabelle a pu être identifiée, ce qui pourra concourir à sa sauvegarde. Un modèle d'expansion a été mis en place en ce qui concerne la Processionnaire, en fonction des différents scénarii possibles du réchauffement climatique.

Outre ces projets d'envergure européenne, d'autres sont élevés au niveau international, comme par exemple un test programmé en Chine, où l'implantation d'arbres européens permet de définir les insectes potentiellement envahissants pouvant élire domicile en Europe.

Les partenariats sur les sujets d'études de l'URZF sont présents dans le monde entier, comme la Chine, la Suisse, l'Italie, le Maroc, le Canada,...

Document 1

Personnel de l'URZE

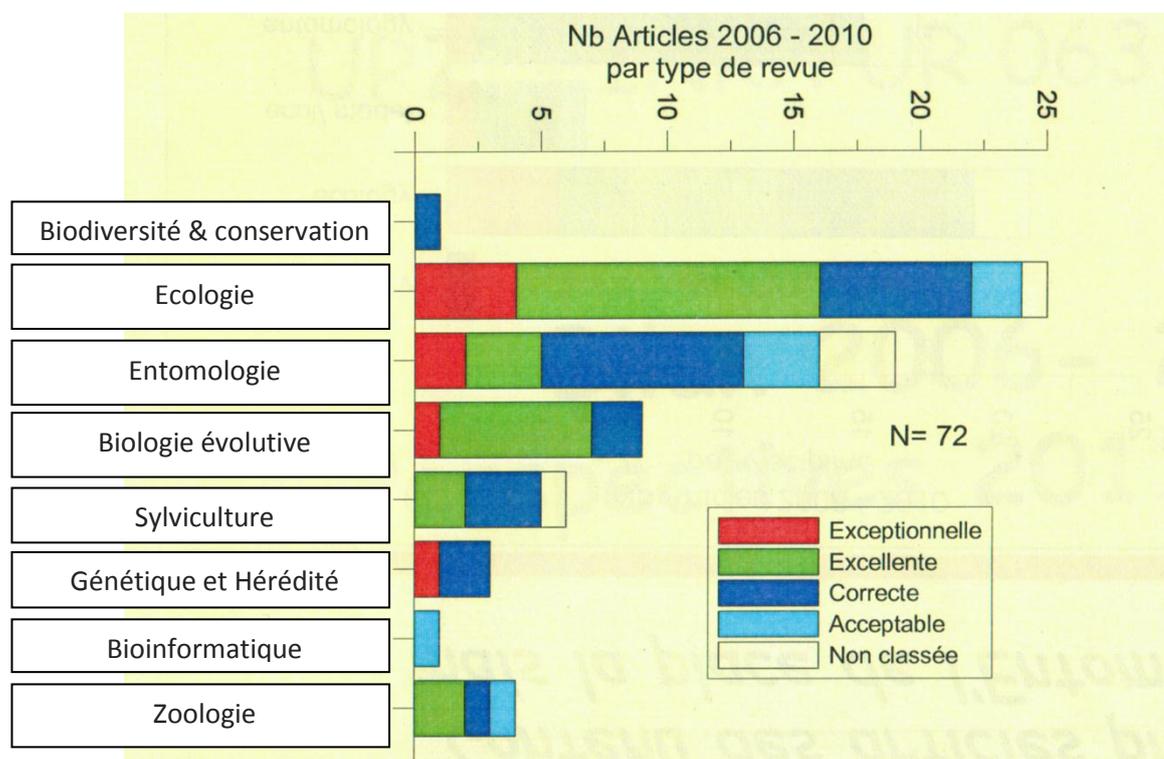


A cause d'un incendie accidentel, l'URZF a été en grande partie détruite. Sa seconde inauguration se fera en 2005.

Le personnel de l'unité, 20 personnes au total, est composé de 7 Chercheurs INRA, 5 ingénieurs INRA, 1 Maître de conférence et 7 techniciens. La totalité du personnel atteint 30 personnes en comptant le personnel non-titulaire, tel que les stagiaires, les masters, les doctorants,... (**Document 1**).

De plus, l'unité a accueilli, depuis 2006, 6 doctorants, 7 Masters II d'Orléans, Rennes, ou encore Valencia (Espagne), 14 Masters I d'Orléans ou Metz et 12 BTS en Biotechnologies de Saint-Jean-de-Braye et Pontivy. Elle a également accueilli des post-doctorants étrangers, venus de Chine, de Russie ou du Mexique, ainsi qu'un chercheur d'Angleterre.

Entre 2006 et 2010, l'URZF a produit 72 publications scientifiques. Chaque publication est évaluée par l'INRA ou par l'AERES et classée en fonction de sa mention allant de l'article non classé à l'article exceptionnel. En plus de ce classement, les publications sont regroupées par domaines.



PARTIE 2

LE SUJET DE RECHERCHE

I. Introduction

De nos jours, les changements climatiques sont au cœur des discussions sur l'avenir. Les scientifiques tentent de savoir quels seront les impacts de ces changements et à quelle rapidité ils auront lieu. Ils cherchent à savoir comment préserver les écosystèmes et gérer leur évolution, et donc à savoir comment les organismes vivants vont répondre à ces changements.

Suivant l'organisme en question, plusieurs réponses sont envisageables :

- * des phénomènes d'expansion d'aire de répartition, d'augmentation du niveau de population.
- * des modifications du cycle biologique.
- * des interactions entre espèces ou entre partenaires (floraison/pollinisateurs, hôte/parasites, proies/prédateurs, ...).
- * des rétractations d'aires de répartitions, d'extinctions,....

Une des approches envisageables pour évaluer ces impacts est donc d'étudier le passé pour comprendre le présent et anticiper l'avenir. On cherche alors à prédire comment les espèces vont réagir au changement climatique actuel en étudiant leurs réactions aux changements climatiques passés. Pour cela, on étudiera en particulier les réactions obtenues entre la dernière ère glaciaire (qui a atteint son refroidissement maximal il y a environ 20 000 ans) et aujourd'hui, période interglaciaire appelée Holocène.

On sait que la plupart des espèces ont réagi à ces fluctuations par des processus d'expansion-contraction de leur aire de répartition (e.g. Hewitt, 1999 ; Hewitt, 2004a ; De Chaine & Martin, 2005 ; Schmitt, 2007). Par exemple, les espèces thermophiles n'ont pas subsisté au nord alors qu'elles ont persisté au sud lors de la période froide, puis ont recolonisé le nord lors du réchauffement climatique post-glaciaire.

Pour déterminer l'aire de répartition passée d'une espèce et ses variations d'abondance au cours du temps, plusieurs approches sont envisageables (e.g. Hewitt, 2004b). Des modèles mathématiques peuvent être développés sur la base de la distribution et de l'abondance actuelles de cette espèce. Ces modèles peuvent ensuite être projetés dans le passé en utilisant des données permettant de reconstituer le climat de l'époque (données climatiques issues d'indicateurs biologiques ou d'archives climatiques telles que les gaz atmosphériques piégés dans la glace). Mais cela suppose que les nécessités climatiques de l'espèce considérée n'ont pas changé au cours du temps. Il est donc préférable de confronter ces modèles à d'autres données. Dans le cas des végétaux, on peut analyser la présence de pollen dans des carottages issus par exemple de tourbières (paléopalynologie). Il est possible également, chez certains animaux ou végétaux, d'étudier la distribution de fossiles datés au carbone 14. En revanche, peu d'insectes laissent de traces de fossilisation. Et plus généralement les données fossiles ou palynologiques ne correspondent qu'à des enregistrements partiels du passé. La dernière approche, qui correspond à celle que nous avons utilisée, consiste à utiliser les outils de la génétique des populations, et plus particulièrement de la phylogéographie, pour inférer l'histoire d'un organisme. Le génome des populations contemporaines est en effet susceptible d'avoir conservé des « empreintes » génétiques des événements qui ont affecté l'évolution de ces populations.

Un des concepts de base des études de phylogéographie est que les zones où les populations n'ont jamais disparues pendant les périodes qui leur sont le plus défavorables présentent une plus grande diversité génétique. Pour l'exemple des espèces thermophiles, l'aire se rétrécit durant les périodes froides et se contracte vers le sud où les populations de ces espèces persistent (régions appelées « refuges glaciaires »). Les populations s'éteignent au nord où elles sont très affectées par l'évolution du climat. Elles recolonisent ces régions plus septentrionales durant l'interglaciaire (périodes chaudes plus favorables).

Donc pour des espèces supportant mal des périodes de refroidissement intense, les populations méridionales contemporaines sont plus anciennes que les populations septentrionales contemporaines

Document 2

Dégâts causés par la processionnaire du pin



et sont restées plus stables au cours du temps. Par conséquent, ces populations méridionales ont eu le temps d'accumuler plus de diversité génétique par mutations. Les populations septentrionales sont quant à elle de formation plus récente. Plus jeunes, elles n'ont pas eu le temps d'accumuler un grand nombre de mutations et sont donc généralement moins variables génétiquement. Leur niveau de diversité génétique dépend en fait fortement du nombre de recolonisateurs et du mode de dispersion à l'œuvre lors de la recolonisation post-glaciaire (e.g. Ibrahim *et al.*, 1996). Les refuges glaciaires des espèces thermophiles européennes sont ainsi principalement localisés dans les trois grandes péninsules du sud de l'Europe (ibérique, italienne et balkanique), même si des refuges plus relictuels et plus nordiques sont de plus en plus souvent mis en évidence.

Outre ces répartitions latitudinales, dans les zones montagneuses, les aires de répartition ont également évolué en altitude au fur et à mesure des oscillations climatiques (Hewitt, 1999 ; Hewitt, 2004a ; De Chaine & Martin, 2005 ; Schmitt, 2007).

La processionnaire du pin est un bon modèle d'étude de l'impact du changement climatique. En effet dès le début des années 1990 elle a réagi aux premiers signes de réchauffement climatique par une expansion de son aire de répartition vers le nord et en altitude (Battisti *et al.*, 2005 ; Robinet *et al.*, 2007 ; Rozenweig *et al.*, 2007). Cette expansion correspond donc à impact avéré de l'augmentation des températures sur un organisme vivant et cette espèce a été retenue comme bioindicateur du changement climatique par l'ONERC (Observatoire National sur les Effets du Réchauffement Climatique).

Par ailleurs, cette expansion de son aire de distribution a entraîné une extension des dégâts sanitaires et phytosanitaires dus à cet insecte (**Document 2**).

Pour en gérer les populations, limiter les nuisances associées et prédire l'évolution de son aire de répartition, il est nécessaire de comprendre les mécanismes qui régissent le processus de colonisation actuel et qui ont aussi probablement régi les processus passés à l'Holocène.

L'objectif de mon stage était d'étudier la distribution de la variabilité génétique de la processionnaire afin de localiser l'ensemble des refuges glaciaires de cette espèce en Europe, pour ensuite pouvoir comprendre la contribution de chacun d'eux au cours du processus d'expansion faisant suite à l'ère glaciaire. La partie occidentale de son aire de distribution ayant déjà été étudiée (Rousselet *et al.*, 2010), mon travail a consisté à séquencer le même locus mitochondrial (fragment du gène COI) sur des échantillons provenant de la partie orientale, en particulier de la région des Balkans.

Document 3

Structures en miroir des poils urticants



Document 4

Vue au microscope des poils urticants



Document 5

Nécrose de la langue d'un chien



Document 6

Perte d'une partie de la langue d'un chien



II. Généralités

A. Le matériel biologique : *Thaumetopoea pityocampa*

1. Biologie Animale

La processionnaire du pin, *Thaumetopoea pityocampa*, est un insecte lépidoptère présentant une forme larvaire phyllophage, la chenille, inféodée à sa plante-hôte, et une forme adulte ailée, le papillon, assurant sa propagation. La forme larvaire est connue pour ses ravages et ses déplacements en procession. Elle est capable de s'attaquer à toutes les essences de pins et de cèdres présents sur le pourtour méditerranéen.

La larve de la processionnaire est une chenille grégaire. Elle vit en colonies pouvant inclure facilement plusieurs dizaines, voire centaines, d'individus et malgré son aspect inoffensif, elle cache une arme de défense très persuasive.

Au-delà du troisième stade larvaire, ceux-ci étant au nombre de 5 au total, la chenille développe des structures en miroir composées de poils urticants très volatils et irritants (**Document 3 et 4**). Le danger de ces poils réside aussi dans le fait qu'ils sont très cassants, et qu'ils libèrent bien plus d'allergènes une fois brisés.

2. Différents impacts de la processionnaire

La chenille de processionnaire du pin cause des dommages de différents ordres.

a. Impact forestier

La chenille processionnaire étant défoliatrice, elle est responsable d'importants dégâts sur les arbres hôtes. Une fois l'éclosion effectuée durant l'été, la chenille commence à se nourrir et va consommer du feuillage jusqu'à son départ en procession de nymphose au printemps.

L'effet est double. Tout d'abord, l'arbre subit le fait d'être privé de son appareil photosynthétique, ce qui conduit à une croissance fortement inhibée, parfois pour plusieurs années. Ce retard de croissance affectant la production de bois, ces dégâts phytosanitaires se traduisent par des pertes économiques pour l'exploitation forestière.

Le second effet est indirect ; l'arbre affaibli est sujet plus facilement aux maladies et aux insectes xylophages à cause des dégâts causés par le passage des chenilles. Ces ravageurs secondaires peuvent quant à eux entraîner la mort de l'arbre et un préjudice économique plus important encore.

b. Impact sanitaire

Comme dit précédemment, la chenille possède un système de défense contre ses prédateurs vertébrés. Les Hommes et les Animaux réagissent assez gravement : l'atteinte au niveau cutané provoque des démangeaisons, des œdèmes, voire des nécroses ou un choc anaphylactique (**Document 5 et 6**). Au niveau oculaire, les poils urticants peuvent engendrer un glaucome ou une cataracte. Enfin, en cas d'inhalation, les effets vont de la simple gêne à la crise d'asthme.

c. Impact économique

Les zones connaissant des fortes concentrations de processionnaires sont souvent restreintes d'accès pour éviter tout dégât sur la santé des personnes localisées au même endroit. Ces zones étant essentiellement situées sur les côtes méditerranéennes, le tourisme s'en trouve affecté.

3. Méthodes de lutte employées

En France, il existe 4 formes principales de lutttes contre les processionnaires du pin en fonction de la surface que l'on souhaite traiter :

Document 7

Piège à chenilles



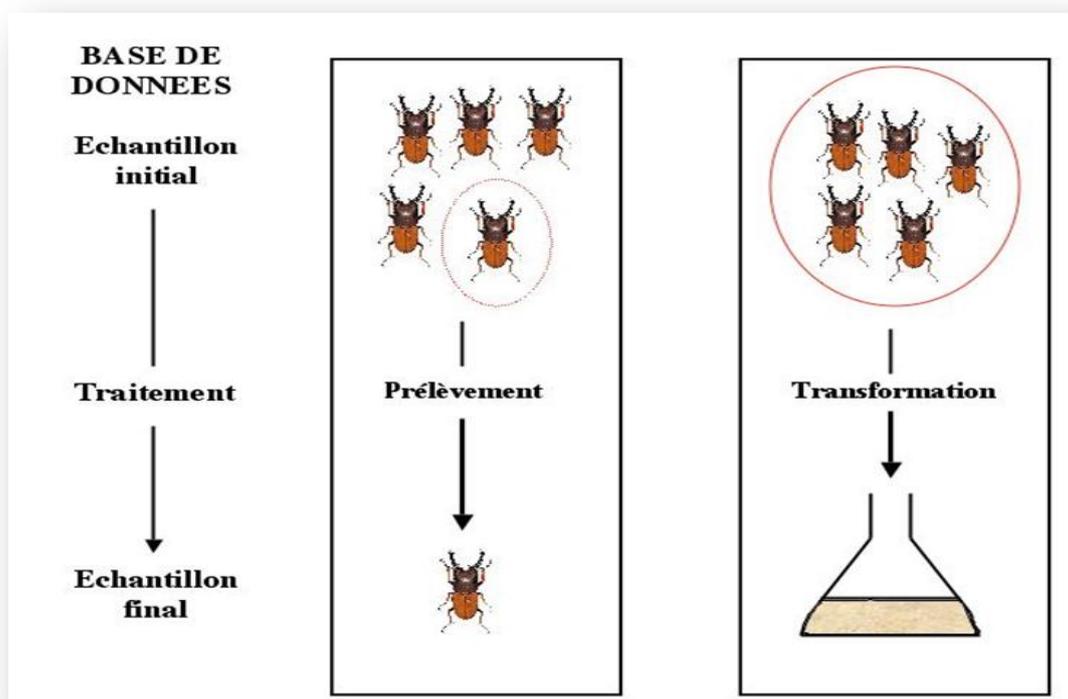
Document 8

Chenilles piégées



Document 9

Gestion des échantillons recueillis



- La lutte biologique : Il s'agit de combattre un organisme par un autre organisme. Dans ce cas-ci, un bacille, *Bacillus thuringiensis Kurstaki* (BTK), est utilisé comme insecticide. La chenille va ingérer les bacilles. Ceux-ci vont libérer une toxine qui va ensuite empêcher la chenille de se nourrir. La processionnaire trouve la mort 2 à 5 jours après l'ingestion.
- La lutte mécanique : Très efficace, mais à petite échelle, elle consiste à enlever les pontes, les pré-nids, ou encore les nids d'hiver des arbres. (**Documents 7 et 8**)
- La lutte chimique : Elle est maintenant interdite en France, sauf en cas de dérogation. L'insecticide utilisé est le Difluorobenzuron, qui perturbe le processus de mue larvaire en inhibant la synthèse de la chitine, composant de l'exosquelette des insectes.
- La lutte sylvicole : Le but est de planter des arbres insensibles à cet insecte. C'est une méthode préventive et non un traitement.

III. Matériel et Méthodes

Le processus de détection et d'observation de la variabilité génétique est composé de plusieurs grandes étapes :

- 1- Echantillonnage des chenilles
- 2- Extraction d'ADN
- 3- Amplification de l'ADN par PCR
- 4- Séquençage.

De plus, comme le fondement d'une expérience scientifique est d'être reproductible et vérifiable, il est nécessaire de pouvoir tracer et exploiter les mêmes échantillons qui ont mené à ces résultats du terrain jusqu'au séquenceur. Donc cela nécessite une traçabilité qui garantit un suivi de tout échantillon ayant servi à l'étude. Il s'agira de trouver une technique permettant cette épreuve.

Echantillonnage et zone d'étude

Le but était de localiser les différents refuges glaciaires dans la partie orientale de l'aire de distribution de la processionnaire du pin (péninsules italienne et balkanique).

L'hypothèse sous-tendant notre plan d'échantillonnage est que les zones présentant une forte diversité chez de nombreuses plantes ont été des zones climatiquement suffisamment stables pour que des populations de processionnaire du pin y persistent au cours du temps (« hotspots » décrits par Médail & Diadéma, 2009 et correspondant aux zones violettes sur le **Document 13**). Ces zones sont donc des candidates potentielles comme zones de refuges glaciaires et notre échantillonnage s'est concentré sur le pourtour de l'Adriatique où Médail & Diadéma en ont décrits plusieurs.

Choix du marqueur

Le marqueur génétique utilisé correspond à un fragment de 873 pb du gène de la cytochrome oxydase I (COI) (Rousselet *et al.*, 2010). Ce gène fait partie du génome mitochondrial. Les mitochondries étant transmises de ce fait uniquement par les femelles, il permet de retracer l'histoire des lignées maternelles. Lors de l'étude publiée en 2010, cette séquence s'est avérée présenter une variabilité suffisante pour observer et interpréter des différences à l'échelle d'étude qui nous intéresse. La variabilité était en effet plus grande que pour les séquences utilisées lors de l'étude publiée en 2009 (Kerdelhué *et al.*, 2009) ce qui a permis d'appréhender plus finement la structure des populations en Europe et les facteurs ayant affecté la distribution de la variabilité génétique neutre de cette espèce.

A. Les Codes-barres et la Gestion des Echantillons

Les chenilles sont prélevées au sein d'un même groupe d'individus (même nid) et sont mises sur le terrain en tube de 10 mL d'alcool à 95°. Les coordonnées géographiques sont enregistrées par GPS et associées à un identifiant provisoire. Entre 2 et 30 chenilles sont incluses dans chaque tube et un code-barres sera attribué à celui-ci à son entrée au laboratoire au retour du terrain (**Document 9**).

Avant l'extraction d'ADN au laboratoire, on prélève sur une seule chenille du tube de 10 mL quelques milligrammes de tissus (tube digestif, tubes de Malpighi, ou tissus musculaires,). Cette chenille sera séparée des autres dans un tube de 2 mL d'alcool 95°. Ce tube, qui contiendra les restes après dissection, sera conservé dans l'alcool à -20°C et cet échantillon fils, appelé « voucher », sera également marqué d'un code-barres (échantillon fils = code-barres lié au code-barres de l'échantillon mère dans la base de données informatisée). Il permettra à quiconque pouvant accéder à cette base de refaire la manipulation et de vérifier les résultats obtenus.

Enfin, une fois l'extraction d'ADN effectuée, et l'ADN mis en solution dans un tube Eppendorf, ce dernier sera marqué à son tour par un code-barres fils dissociable du précédant.

Ainsi, un isolement d'une chenille en tube de 2 mL d'alcool à partir du tube de 10 mL est vu comme une transformation. Cette action ajoutée à la base de données permet donc de lier les deux tubes. Il en est de même pour le passage du tube de 2 mL au tube d'ADN en solution. Les transformations sont donc le lien unissant les échantillons.

Ces trois tubes sont liés et les codes-barres doivent par conséquent être également liés dans une base de données.

L'INRA a donc mis au point un logiciel de Gestion des Echantillons, accessible uniquement à l'institut : ce programme permet de répertorier chaque échantillon grâce à leur code-barres. Il permet d'inclure toute information nécessaire, comme par exemple, la localisation GPS et la date du prélèvement, le mode et le lieu de conservation, l'essence du pin-hôte, et enfin d'identifier les transformations qui ont eu lieu une fois les échantillons marqués.

Cette opération informatique est effectuée par le technicien de laboratoire utilisant les échantillons. Les codes-barres sont inclus dans la feuille de route entrée dans le séquenceur et associant à chaque échantillon des informations saisies par l'opérateur. A partir de là, le séquenceur nommera automatiquement les fichiers de sortie de chaque échantillon, dont le chromatogramme, en incluant le code-barres. Cette information figurant sur chaque séquence permet donc de remonter jusqu'aux informations générées lors de la collecte de l'échantillon, ou celles saisies dans la base de données.

B. L'extraction d'ADN

La première étape consiste à extraire l'ADN génomique (des compartiments nucléaire et mitochondrial). Il faudra que l'ADN soit pur, et sans contaminants comme des protéines pour assurer sa conservation (enzymes dégradant l'ADN) et éviter d'inhiber la polymérase utilisée dans l'étape suivante lors de la PCR. Lors de l'utilisation d'amorces non spécifiques, utilisables chez un grand nombre d'espèce comme c'est le cas dans notre étude, il faut par ailleurs veiller à éviter la contamination par d'autres sources d'ADN que celle de notre échantillon.

Cette étape est effectuée grâce à différents kits d'extractions mis en place par différentes entreprises. Le kit utilisé sur la quasi-totalité du stage aura été NucleoSpin® Tissue XS de MACHEREY-NAGEL. Une série d'extractions, au nombre de 8, aura été exécutée à l'aide de deux autres kits, lors d'une comparaison quantitative et qualitative des trois kits.

L'extraction d'ADN s'initie avec une collecte de tissus d'un individu. Les tissus les plus richement composés en ADN sont ceux du tube digestif, des tubes de Malpighi, ou encore des muscles, et les plus pauvres en pigment et autres composés susceptibles d'affecter la pureté de l'échantillon. Une petite quantité sera donc ôtée de l'individu, ce qui sera suivi par le protocole d'extraction de l'**Annexe1**.

La quantité d'ADN présente pourra être contrôlée de deux façons :

Photo 1 : Le Nanodrop

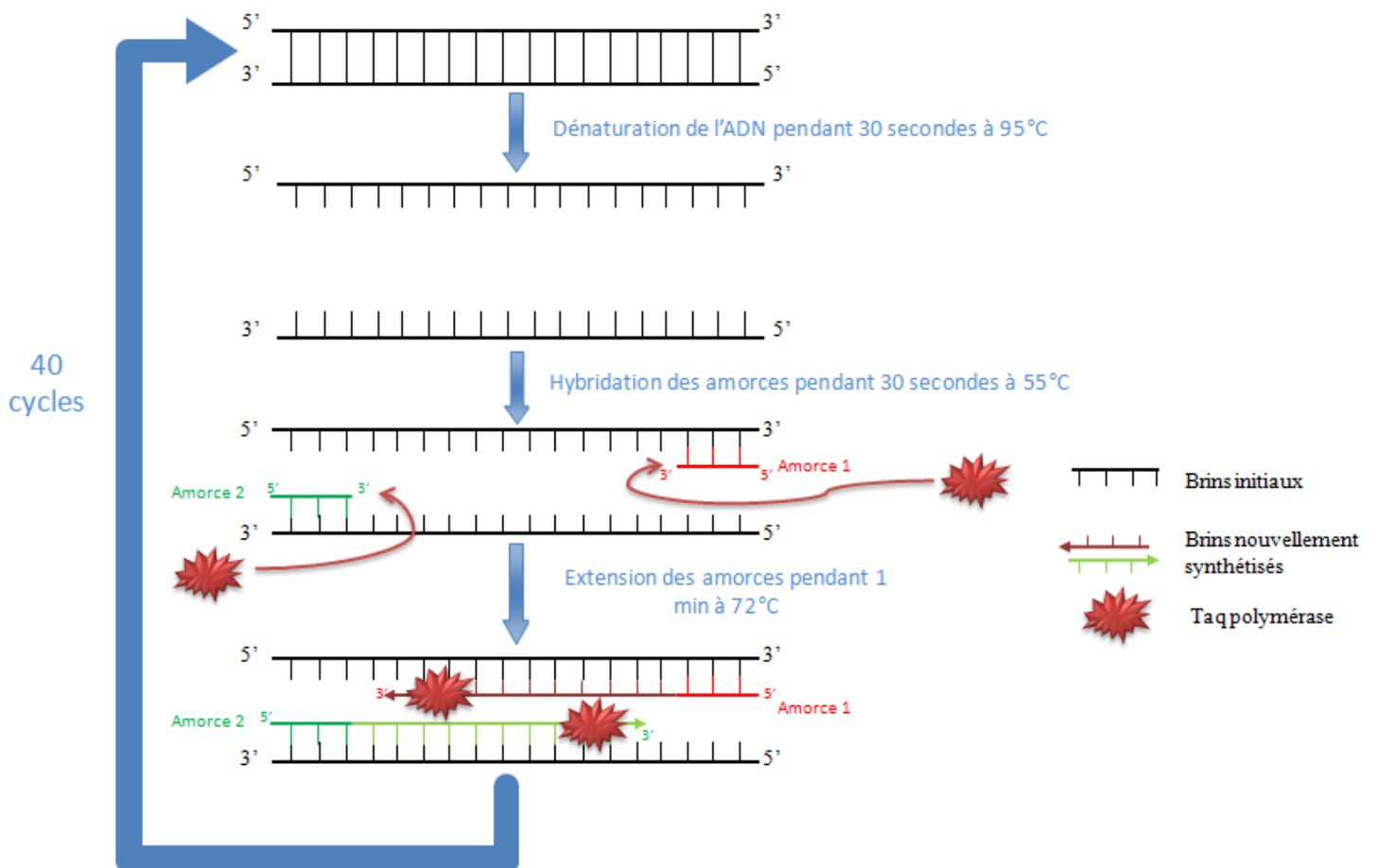


Photo 2 : Les thermocycleurs



Document 10

Principe de la PCR



- ♦ Par électrophorèse : 5 µL de produit d'extraction vont être mélangés à 5 µL de Bleu de charge, puis ces 10 µL seront ensuite déposés dans un puits de gel d'électrophorèse 1% (1g d'agarose pour 100 mL de Solution Tampon 1X) et le résultat pourra être comparé à un marqueur de taille.
- ♦ Par Nanodrop (cf. *Photo 1*) : Le Nanodrop est un spectrophotomètre. A la différence des spectrophotomètres habituels, il permet de n'utiliser des très petits volumes (de l'ordre du µL) pour effectuer des mesures. De plus, le logiciel utilisé avec le Nanodrop permet, en mesurant l'absorbance, de connaître la quantité et la qualité de l'ADN extrait.

La séparation de l'ADN avec les tissus et les protéines est assurée par une différence de pH.

C. L'amplification de l'ADN par PCR

Cette étape permet d'amplifier sélectivement le fragment cible grâce à des amorces spécifiques. Ici, ce dernier est un gène du génome mitochondrial.

Pour une amorce de 20 nucléotides, on peut trouver 4 possibilités aux 20 sites : A, T, C ou G.

Donc la probabilité de trouver un autre site d'accroche identique est de :

$$\frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4}$$

Soit $\frac{1}{4}$ à la puissance 20 = 0,00000000000090949470177

On a donc $\frac{1}{0,00000000000090949470177}$ chances de trouver un autre lieu d'accroche sur le génome, soit 1 sur 1 099 511 627 780 pour une seule amorce !

L'ADN présent après l'extraction n'est pas utilisé en entier. Une fraction (1 µL) sera utilisée pour réaliser l'étape d'amplification par PCR de façon à conserver le reste pour d'autres tests si nécessaire, et éviter ainsi de repasser par l'étape d'extraction.

Le microlitre d'ADN passera par l'étape de PCR. Cette étape permet de démultiplier l'ADN (**Document 10**).

On effectue un mélange réactionnel comme indiqué en **Annexe 2**. Chaque réactif a une fonction bien spécifique :

- ♦ Le Tampon 10X : il maintient un pH constant et optimal pour l'activité de la Taq polymérase.
- ♦ Les dNTP : ils permettent un apport de bases azotées (A, T, C, G) à la solution, bases qui seront utilisées à des fins de reproduction de l'ADN.
- ♦ MgCl₂ : C'est un cofacteur essentiel de la Taq polymérase. Il a une action sur la spécificité des amorces.
- ♦ Amorces : elles permettent de fixer la Taq polymérase sur le début de la séquence d'ADN à amplifier. On utilise les amorces Jerry et Pat qui ont les mêmes températures d'actions identiques (cf. **Annexe 4**).
- ♦ Bétaïne : elle permet de stabiliser la Taq polymérase et de faciliter l'amplification des structures riches en liaisons G-C, comme l'ADN.
- ♦ Taq polymérase : Permet une grande rapidité de synthèse d'ADN à haute température. Ainsi, à 95°C, la Taq polymérase associe environ 60 bases/sec.

Le mélange réactionnel sera ajouté à l'ADN à amplifier et la solution passera au thermocycleur comme indiqué dans le protocole (cf. *Photo 2*). Après cette amplification, il s'agira de purifier une nouvelle fois la solution, pour éviter aux réactifs de contaminer la solution lors du séquençage.

Photo 3 : Le séquenceur et son ordinateur

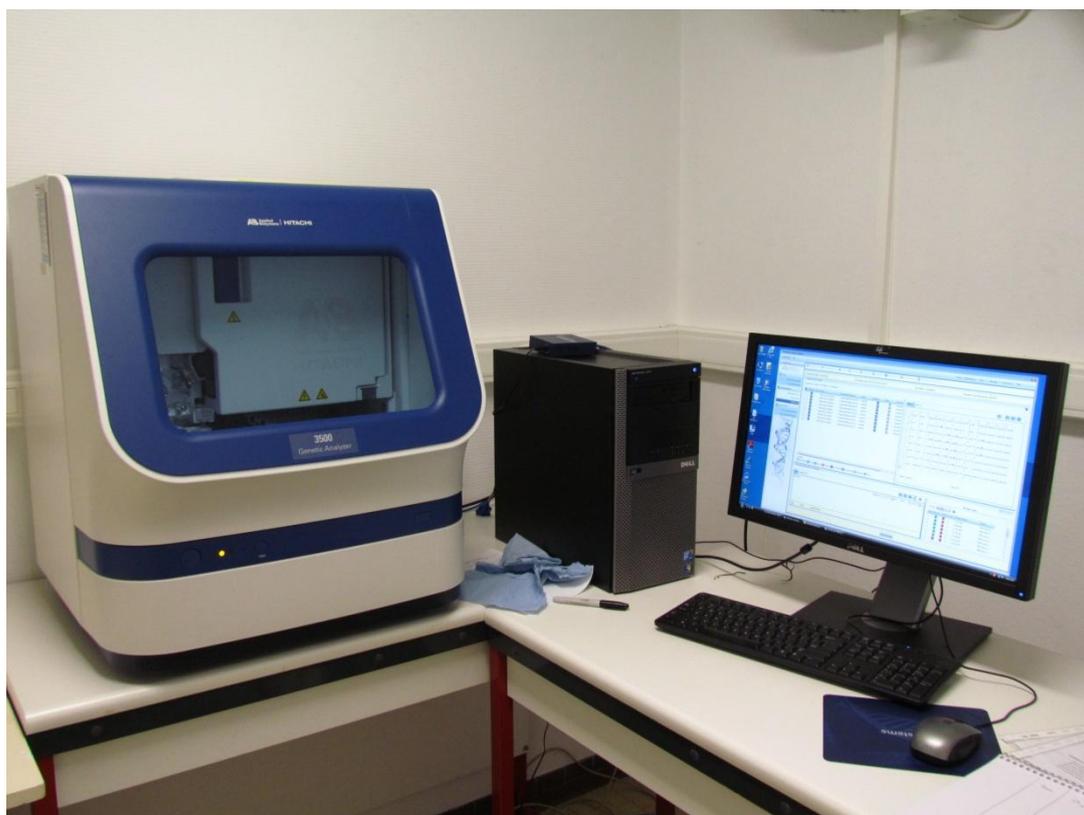
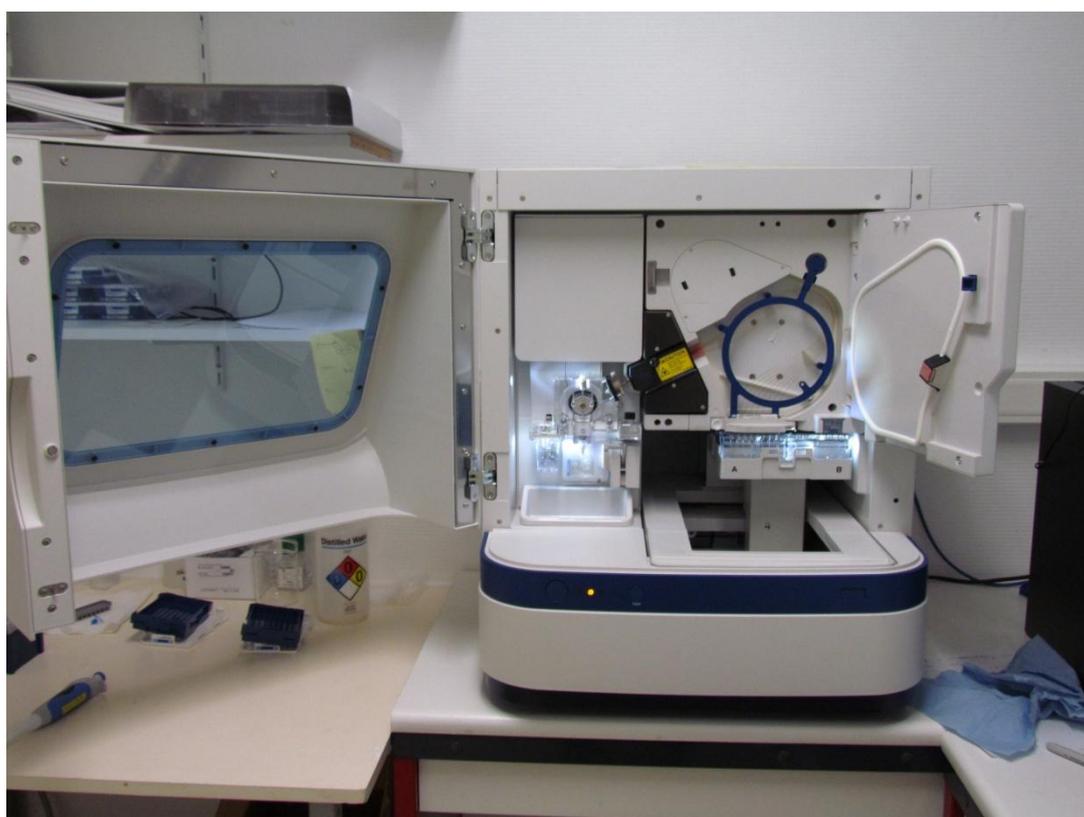


Photo 4 : Le séquenceur



D. Réactions et précipitations de séquences

La réaction de séquence est élaborée grâce à la **Méthode de Sanger** (cf. **Annexe 6**)

Cette méthode consiste à polymériser l'ADN tout en y associant une base azotée à laquelle un groupement –OH a été remplacé par un atome d'hydrogène. Ainsi, après association d'une telle base modifiée, la polymérisation de l'ADN n'est plus possible, la synthèse du brin s'arrête.

Ces bases azotées sont appelées des ddNTP. Ceux-ci sont marqués à l'aide d'un fluorochrome qui sera détecté par le laser du séquenceur.

La polymérase incorpore au hasard les dNTP et les ddNTP qui sont en « compétition » dans le mélange réactionnel. Au cours du processus d'amplification, une quantité « astronomique » de fragment est générée, et la polymérisation peut s'arrêter à n'importe quelle base de la première après l'amorce à la 873^{ème} dans notre cas. Même si des fragments courts sont générés plus fréquemment que des fragments longs, statistiquement, étant donné la quantité de fragments générés, la polymérisation s'arrête un grand nombre de fois à tous les sites du fragment cible, et on obtient des fragments allant d'une longueur de 21 bases à 873 tous marqués par un fluorochrome indiquant si la réaction s'est arrêté sur un A, un T, un C ou un G. Il ne reste plus alors qu'à trier les fragments générés en fonction de leur taille et à détecter la fluorescence associée à une longueur donnée. La vitesse de migration des fragments dans le polymère contenu dans le capillaire du séquenceur dépendant de leur longueur. L'ordre de passage au niveau du laser de chaque couleur de fluorescence permet de reconstituer la séquence nucléotidique.

La précipitation des séquences permet d'éliminer tous les sels et réactifs non utilisés. Cette étape sera effectuée selon l'**Annexe 5**. Une fois le protocole terminé, il ne reste qu'un culot invisible d'ADN. Ce culot étant invisible à l'œil nu, il faudra bien repérer où celui-ci est censé se trouver, et réaliser le protocole avec grand soin. Une fois arrivé à l'étape finale de séquençage, il suffit de remettre le culot en solution dans 30µL d'eau ultrapure.

E. Analyse des réactions de séquence

Le séquenceur Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer est installé dans une salle climatisée et il n'y a que 3 personnes de l'INRA d'Orléans habilitées à l'utiliser (cf. **Photo 3 et 4**).

L'étude de séquençage s'effectue sur plusieurs heures, à raison de 8 puits toutes les deux heures environ, sous le principe de l'électrophorèse capillaire. La solution à étudier passe à travers un capillaire de verre extrêmement fin qui séparera les réplifications du fragment du gène COI suivant leur taille. Les fragments les plus petits traverseront le capillaire plus rapidement que les longs fragments.

Le retour des données du séquenceur apparaît sous forme d'un électrophorégramme pour chaque échantillon, présentant 4 courbes, une pour chaque base azotée. Un pic apparaît lorsqu'un fragment terminé par un ddNTP fluorescent passe devant le laser du séquenceur (cf. **Annexe 7**). Celui-ci excite la molécule de ddNTP qui émet alors une fluorescence. Cette fluorescence sera captée par une caméra CDD (Charge-Coupled Device). Le signal enregistré sera converti en base azotée associée à la couleur fluorescente.

Chaque courbe est identifiable par sa couleur : la courbe rouge pour la Thymine, la bleue pour la Cytosine, la verte pour l'Adénine et la courbe noire pour la Guanine.

Pour chaque individu, et donc chaque produit de PCR, deux amorces sont utilisées sur chaque séquence. Par conséquent, les deux séquences Issues du même fragment de PCR seront assemblées et traitées l'une par rapport à l'autre.

Une ambiguïté de séquençage est en fait une zone de l'électrophorégramme qui n'a pas réussi à être analysée parfaitement par le logiciel. Elle peut être de différentes natures :

- ♦ une base ajoutée dans une des deux séquences, issue d'une trop longue exposition au faisceau d'une base azotée (cf. **Annexe 8**)
- ♦ une discordance entre les deux séquences sur une base azotée.
- ♦ Une suspicion venant du séquenceur sur une position lié à la faiblesse du signal (c'est-à-dire de l'amplification : peu de fragments amplifiés donc plus faible fluorescence qui a du mal à sortir du bruit de fond).

Ces ambiguïtés peuvent être dues à un artefact d'ordre technique mais aussi à un mélange de séquences liée à une amplification non spécifique ou parasite (séquence dupliquée dans le génome, c'est-à-dire existant en copies multiples et variant entre copies, contamination : par exemple tissu de parasites extrait en même temps que le tissu de l'échantillon, etc.).

Il faudra donc trancher et corriger les erreurs mises en évidence. Le logiciel CodonCode Aligner concourra à cette correction. La première correction de séquence est faite « en aveugle », c'est-à-dire sur la seule base de la comparaison des deux séquences « forward » et « reverse », ici respectivement Jerry et Pat, et aboutit à la construction d'une séquence consensus.

Lors d'un doute sur une position, s'il est impossible pour le séquenceur de trancher, le code IUPAC a été créé pour annoter chaque problème et limiter les possibilités de bases candidates à une position. Ainsi, si le séquenceur n'a pu déterminer s'il s'agit d'un C ou d'un T, la lettre Y remplacera la base.

Code IUPAC

	A	C	G	T
A	-	M	R	W
C	M	-	S	Y
G	R	S	-	K
T	W	Y	K	-

A	C	G	T
B	D	H	V

A ou C ou G ou T
N

F. Analyse des données

Une fois les séquences corrigées, retravaillées et analysées par un logiciel, celles-ci sont alignées et comparées entre elles suivant leurs différences. Une séquence particulière de nucléotides (qui est transmise en bloc à la descendance) définit un haplotype. Le premier haplotype, le plus commun, présent principalement dans l'est de la France et en Italie, a servi de base à cette comparaison (séquence de référence)

Chaque substitution par rapport à la séquence de référence est revérifiée au niveau de l'électrophorégramme du fragment reverse et forward pour s'assurer qu'aucune erreur n'aurait été oubliée lors de la première phase de correction en aveugle (c'est-à-dire sans comparaison avec la séquence de référence).

Une fois l'alignement réalisé et vérifié, il est remis par le technicien de laboratoire au chercheur chargé de l'analyse du jeu de données. Celui-ci utilisera différents logiciels de génétique de populations pour analyser le niveau de parenté entre les haplotypes mis en évidence et rechercher les signatures génétiques des processus démographiques qui ont affecté les populations étudiées.

IV. Résultats expérimentaux

A. Comparaison des kits (cf. Annexe 9)

Lors de cette expérimentation, il a été nécessaire d'utiliser approximativement le même type et la même quantité de tissus. La même partie du tube digestif aura donc été prélevé, sur des chenilles de même taille, au nombre de 12 et à raison de 4 chenilles par kit.

Bien que sensiblement différents, les protocoles pour des extractions d'ADN à partir de tissus auront été scrupuleusement suivis.

Le Nanodrop fait le rapport entre l'absorbance de l'ADN et celle des protéines qui pourraient le polluer pour connaître la pureté des protéines. Un rapport compris entre 1,85 et 2 assure une solution d'ADN relativement pure.

De plus, le volume final d'extraction étant différent entre Macherey-Nagel (100µL), et Sigma et Quiagen (200µL), il est nécessaire de rapporter la quantité d'ADN extrait mesuré par le Nanodrop au volume final.

Les résultats montrent qu'il y a une importante différence entre la pureté (A260/A280) et la quantité d'ADN entre chaque kit, mais peu de différences au sein d'un même kit (**Document 11**).

B. Analyse des séquences

Le tableau ci-contre rend compte du nombre d'haplotypes différents répertoriés durant le stage (**Document 12**).

On constate donc que 11 haplotypes différents ont été obtenus après correction des séquences. Seules les différences avec l'haplotype 1, au nombre de 28 sur les 878 bases, ont été insérées dans ce tableau pour faciliter la comparaison et la compréhension, l'haplotype 1 étant le plus communément trouvé.

De plus les positions signalées en rouge sont des positions qui présentent une mutation non synonyme, c'est-à-dire que les acides aminés correspondants au triplet de bases azotées concerné n'a pas la même fonction.

Les haplotypes ont été matérialisés par des cercles, liés entre eux par leurs différences. En effet, les cercles sont séparés les uns des autres en fonction du nombre de bases azotées qui diffèrent. De plus, leur taille dépend du nombre d'individus recueillis possédant cet haplotype.

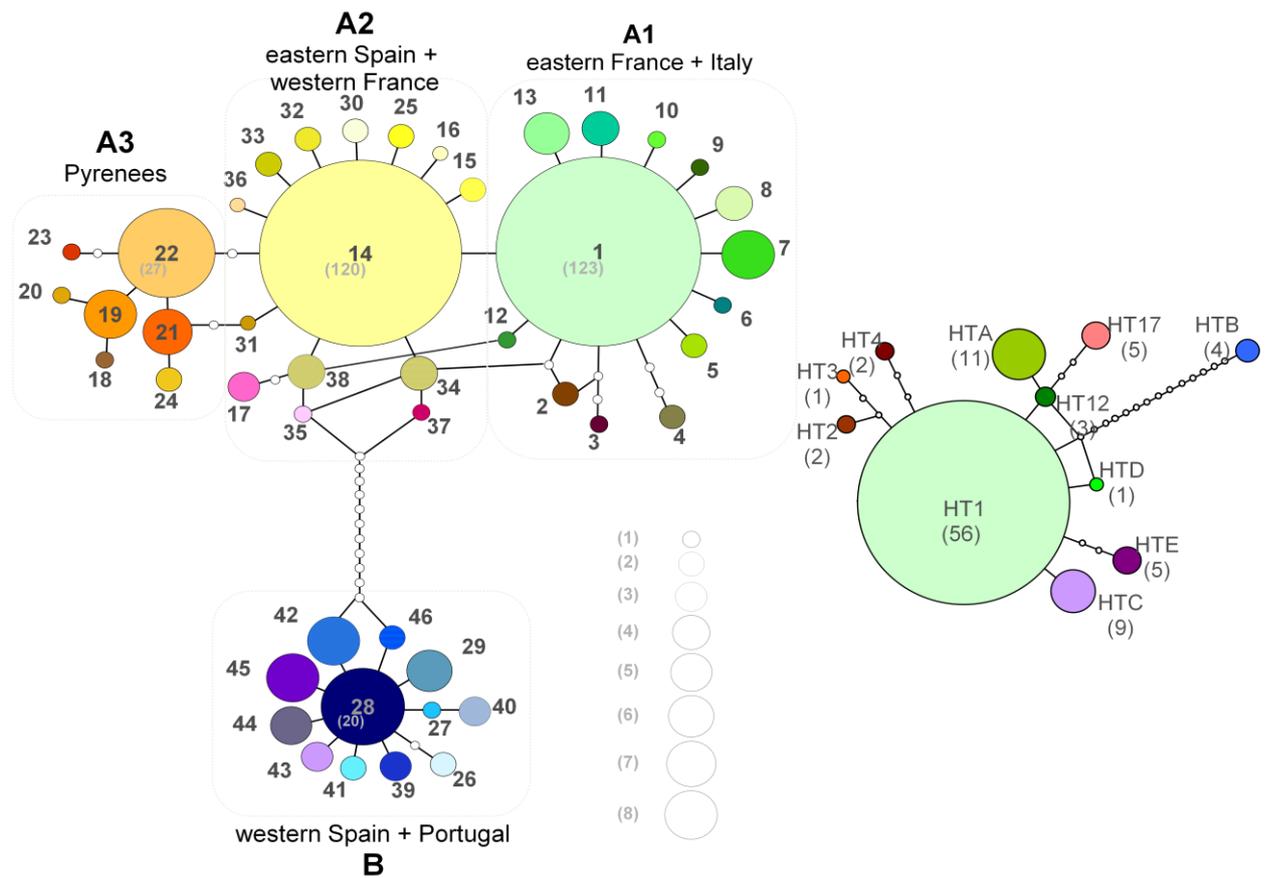
Un parallèle est fait avec le réseau d'haplotypes déjà créé par le passé avec les haplotypes découverts en Europe de l'ouest (Péninsule ibérique, France, Italie), et publié dans *Journal of Biogeography* (2010) par Frédéric Médail et Katia Diadema du CNRS.

Le but était donc de localiser les différents refuges glaciaires de l'haplogroupe oriental en se focalisant sur le pourtour de l'Adriatique non étudié jusqu'ici. Plus précisément, il s'agit en particulier de faire l'étude des processionnaires dans les Hotspots de diversité décrits par Frédéric Médail et Katia Diadema du CNRS dans *Journal of Biogeography* (2009), et correspondant aux zones violettes sur le **Document 13**, car ce sont des zones candidates potentielles comme zones de refuges glaciaires (zone de stabilité pour de nombreuses espèces de plantes).

A l'ouest de l'Europe avaient été mis en évidence 4 haplogroupes (nommés A1, A2, A3 et B). Les refuges glaciaires de A1 et de A3 ont été localisés respectivement dans l'est de la Péninsule ibérique (A1) et en Catalogne (A3).

Pour l'haplogroupe A1, la partie orientale n'ayant pas été étudiée il était difficile de connaître son origine qui peut être du sud-est de la France présentant de la variabilité génétique assez présente ou Balkans n'ayant pas encore été étudié.

Mon travail s'est limité à étudier la partie Est de l'Europe, de l'Italie à la Bulgarie pour identifier d'éventuels nouveaux refuges. Les données montrent une grande diversité et de la divergence. On peut donc conclure de la présence de populations anciennes en Ligurie (Rollo), dans le nord de l'Adriatique (Monfalcone, Trieste, Buje, Lošinj, Pag) et au Monténégro.



Après avoir mis en parallèle les 2 documents (**Document 13 et 14**), on peut remarquer que chacune de ses zones correspond à un Hotspot de diversité décrit par Médail et Diadema.

C'est donc une bonne chose que d'obtenir ces superpositions. On peut donc en conclure que la technique utilisée est concluante.

Grâce au **document 15**, on peut faire le rapprochement entre les différents haplotypes trouvés en Europe par le passé, et ceux obtenus durant mon stage. On peut donc visualiser l'étendue de chaque haplotype.

V. Conclusions

A. Conclusion scientifique

Grâce à ce stage, on a pu mettre en évidence la présence de hotspots concernant les processionnaires. On sait donc que durant la dernière période glaciaire, les chenilles ont pu s'isoler en des zones qui leur ont été favorables, tant au niveau alimentaire qu'au niveau climatique.

Cependant, comme il s'agit d'une zone d'étude relativement isolée des autres surfaces déjà analysées, il n'est pas encore possible de conclure à un possible chemin de propagation. Il faudra pour cela étudier le reste des Balkans, et continuer sur l'est de l'Europe.

On a également pu découvrir 5 nouveaux haplotypes qu'il faudra ajouter par la suite au réseau déjà existant.

Le problème qu'il reste est que l'on a découvert plusieurs refuges glaciaires à l'est. Parmi tous ces refuges, il va falloir trouver duquel provient l'haplotype 1, le plus semblable à tous les autres. Avec de la chance, on obtiendra après études complémentaires une zone de diversité avec de nombreux haplotypes très proches de lui ou alors une zone de diversité majeure, tellement importante qu'il y aura de bonnes chances qu'ils viennent de là (la partie nord de la Croatie, la Slovénie, l'est de l'Italie méritent d'être approfondies de ce point de vue). On peut aussi utiliser d'autres marqueurs comme les microsatellites pour trouver des allèles communs entre populations avec l'haplotype 1 et un refuge particulier.

Enfin, ce stage a permis de comparer des kits d'extractions d'ADN. On peut maintenant dire avec certitude que l'un des trois kits est plus performant pour ce protocole.

B. Conclusion personnelle

Ce stage a été pour moi une très bonne expérience dans le monde du travail. J'ai pu manipuler avec beaucoup de matériel, en utilisant plusieurs protocoles, plus ou moins compliqués.

Il a nécessité une bonne organisation pour arriver aux fins souhaitées. Il fallait bien évidemment gérer toutes les journées de manipulations mais également s'organiser avec le reste du personnel pour pouvoir utiliser le matériel tel que les thermocycleurs ou le séquenceur.

Il a fallu être autonome pour ne pas avoir à demander de l'aide tous les jours, mais également être scrupuleux pour faire le travail tous les jours de façon identique et sans erreur.

De plus, ce stage m'a permis de garder un lien avec la Biologie Générale que j'ai abandonnée. Le BTS Biotechnologies est centré sur la biologie moléculaire, la biochimie ou la biologie cellulaire. Ayant abandonné la Licence de Biologie Pour un manque de manipulation, j'ai également dû abandonner les matières comme la Biologie Animale, la Biologie Végétale ou la Physiologie.

Grâce à ce stage, j'ai pu avoir tous les aspects de la Biologie et je pense que c'est qui m'a le plus plu.

ANNEXES

Photo 5 : La centrifugeuse



ANNEXE 1

PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN A PARTIR DE TISSUS CELLULAIRES

UTILISATION DU KIT NUCLEOSPIN® TISSUE XS :

- ✓ Après avoir ouvert la chenille, extraction de quelques tissus musculaires et des tubes de Malpighi, stockés en tube Eppendorf.
- ✓ Ajout de 80 µL de tampon de lyse T1.
- ✓ Broyage à l'aide d'un pilon plastique.
- ✓ Ajout de 8 µL de Protéinase K.
- ✓ Vortexer.
- ✓ Mise en Bain-marie à 56°C au minimum 1h30. Possibilité de maintien plusieurs heures.
- ✓ Vortexer.
- ✓ Ajout de 80 µL de tampon B3.
- ✓ Vortexer.
- ✓ Incubation 10 min à 70°C au Bain-marie.
- ✓ Vortexer.
- ✓ Ajout de 80 µL d'éthanol 96-100%.
- ✓ Vortexer.
- ✓ Préparation de tubes du Kit (Tube de récupération + Colonne filtrante), annotés suivant l'échantillon.
- ✓ Dépôt de la solution d'ADN dans la colonne avec une pipette.
- ✓ Centrifugation 11 000 g pendant 1 min (cf. *Photo 5*)
- ✓ Colonne placée sur un nouveau tube de récupération.
- ✓ Ajout dans la colonne filtrante de 50 µL de Tampon B5.
- ✓ Centrifugation 11 000 g pendant 1 min.
- ✓ Ajout dans la colonne filtrante de 50 µL de Tampon B5.
- ✓ Centrifugation 11 000 g pendant 2 min.
- ✓ Elimination le tube de récupération et placer la colonne sur un tube Eppendorf 1,5 mL.
- ✓ Ajout de 50 µL de Tampon BE.
- ✓ Incubation 1min sur la paillasse et centrifugation 11 000 g pendant 1 min.
- ✓ Ajout de 50 µL de Tampon BE.
- ✓ Incubation 1min sur la paillasse et centrifugation 11 000 g pendant 1 min.
- ✓ Elimination de la colonne de filtration.
- ✓ Vortexer et centrifuger le tube Eppendorf.

L'ADN peut être conservé au congélateur à -20°C.

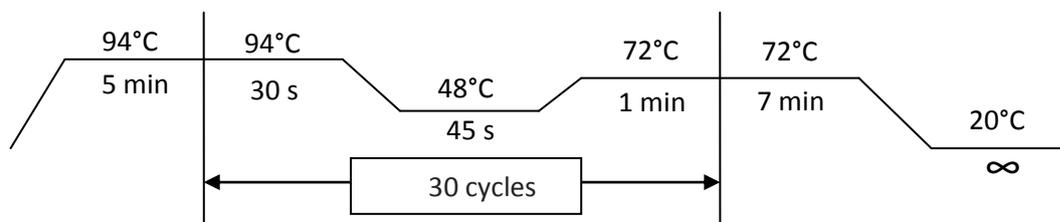
ANNEXE 2

PROTOCOLE DE PCR A PARTIR D'UNE EXTRACTION D'ADN :

25 μL de Mix PCR dont 1 μL de solution d'extraction d'ADN pour une molarité de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de MgCl_2 :

Réactifs	Volume en μL
H_2O	13
Tampon 10X	2,5
dNTP (10 mM)	2,5
MgCl_2 (25 mM)	2,5
Amorce F (10 μM)	1
Amorce R (10 μM)	1
Bétaïne (1mg/mL)	0,5
Taq polymérase (1U/ μL)	1

- ✓ Vortexer et centrifuger
- ✓ Mettre dans le thermocycleur et faire tourner le programme ainsi :



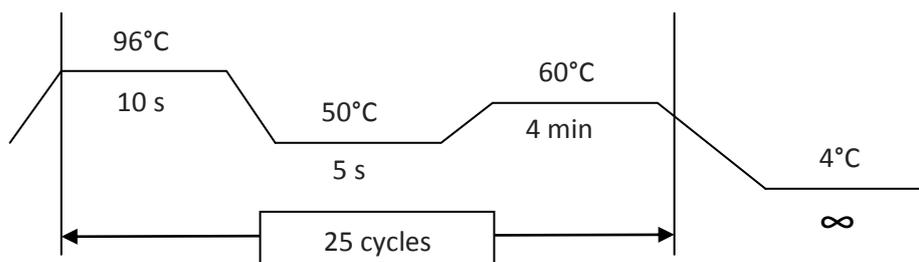
- ✓ Conserver les tubes au réfrigérateur

ANNEXE 3

PROTOCOLE DE REACTION DE SEQUENCE :

Dans un tube de 0,2 mL de thermocycleur, mettre dans l'ordre :

- ✓ 3 μL de Tampon séquence
- ✓ 2 μL de Big Dye
- ✓ 1 μL d'amorce à 3,3 μmol
- ✓ 4 à 13 μL de produit PCR purifié (80 à 100 ng d'ADN)
- ✓ H_2O ultrapure qsp 20 μL suivant la quantité d'ADN qui a été introduite
- ✓ Vortexer et centrifuger
- ✓ Mettre dans le thermocycleur et faire tourner le programme ainsi :



Précipiter les produits ou congeler le tube

ANNEXE 4

Séquence des amorces utilisées

Jerry : CAACATTTATTTTGATTTTTGG
Pat : TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA

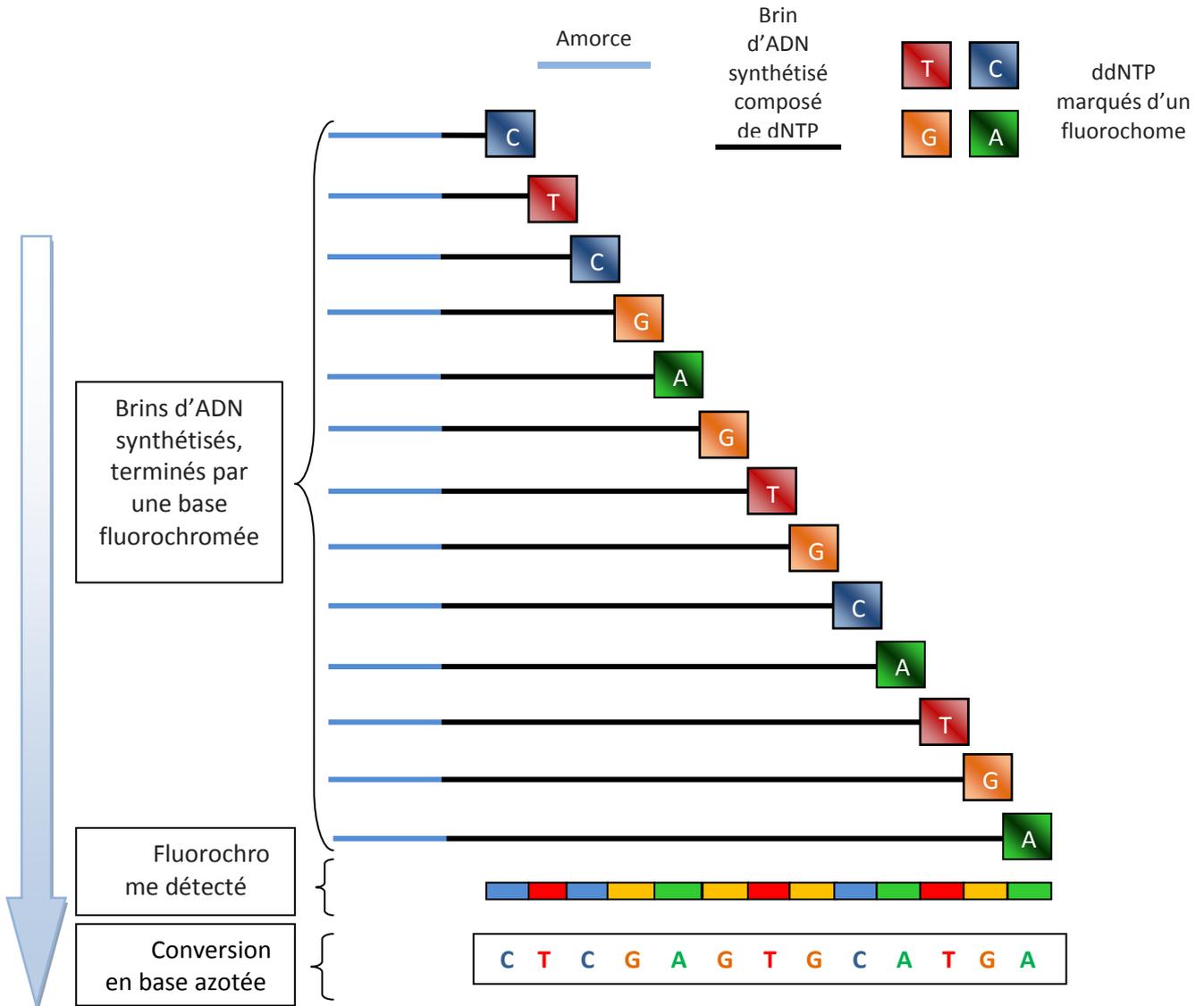
ANNEXE 5

PROTOCOLE DE PRECIPITATION DE SEQUENCE :

- ✓ Transférer la séquence dans un tube Eppendorf
- ✓ Ajouter 16 µL d'eau ultra pure et 64 µL d'éthanol 95°
- ✓ Vortexer, centrifuger et laisser 15 min à l'obscurité
- ✓ Centrifuger 20 min à vitesse maximale
- ✓ Extraire le surnageant à la pipette
- ✓ Laver avec 200 µL d'éthanol 70°
- ✓ Vortexer puis centrifuger à vitesse maximale pendant 15 min
- ✓ Vider le surnageant et laisser sécher à l'étuve à 37°C, tube ouvert
- ✓ Possibilité de conserver le tube à -20°C au congélateur
- ✓ suspendre la séquence dans 30 µL d'eau ultrapure avant de déposer la suspension dans une plaque multi puits
- ✓ Analyser par le séquenceur automatique

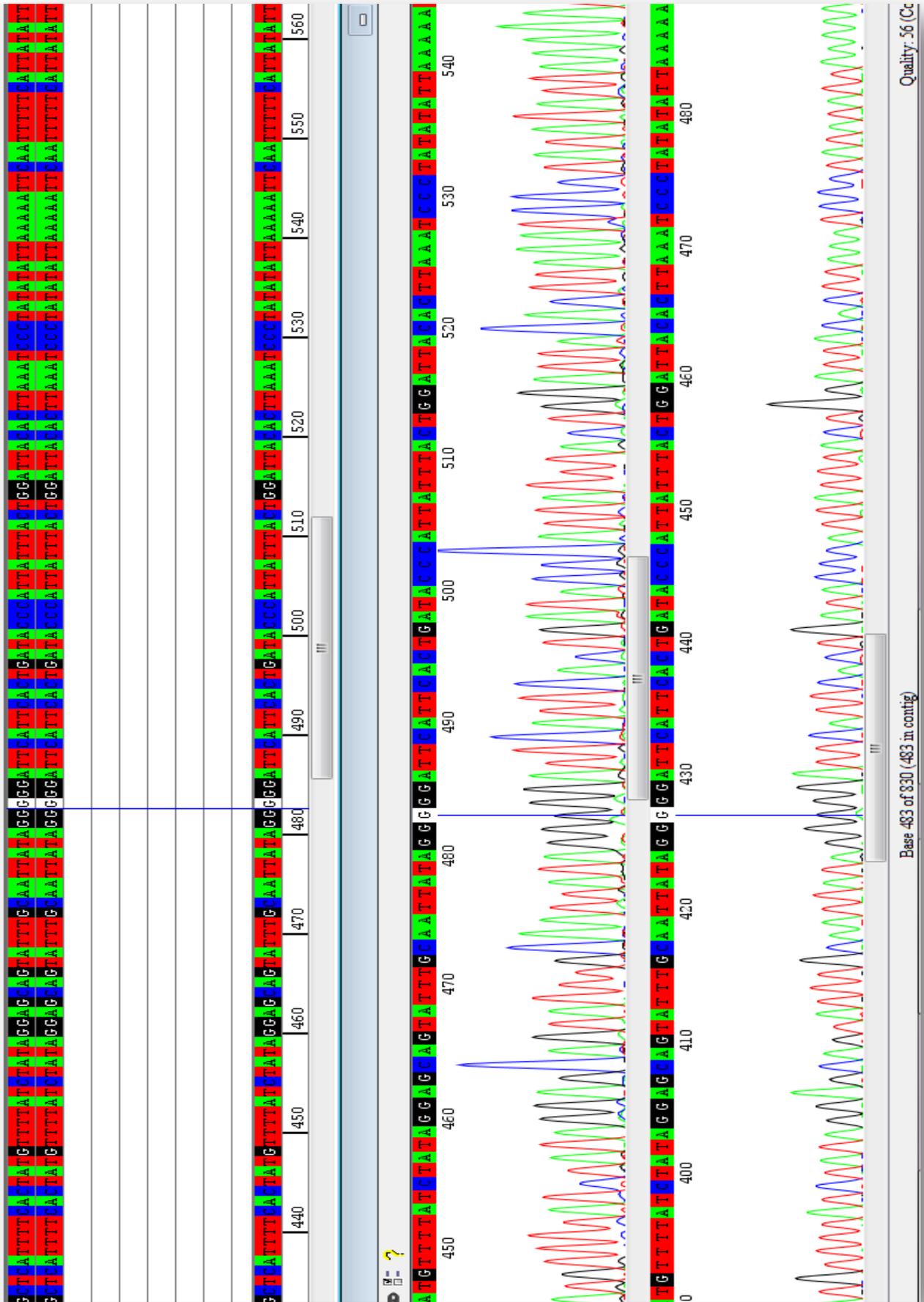
ANNEXE 6

Méthode de SANGER



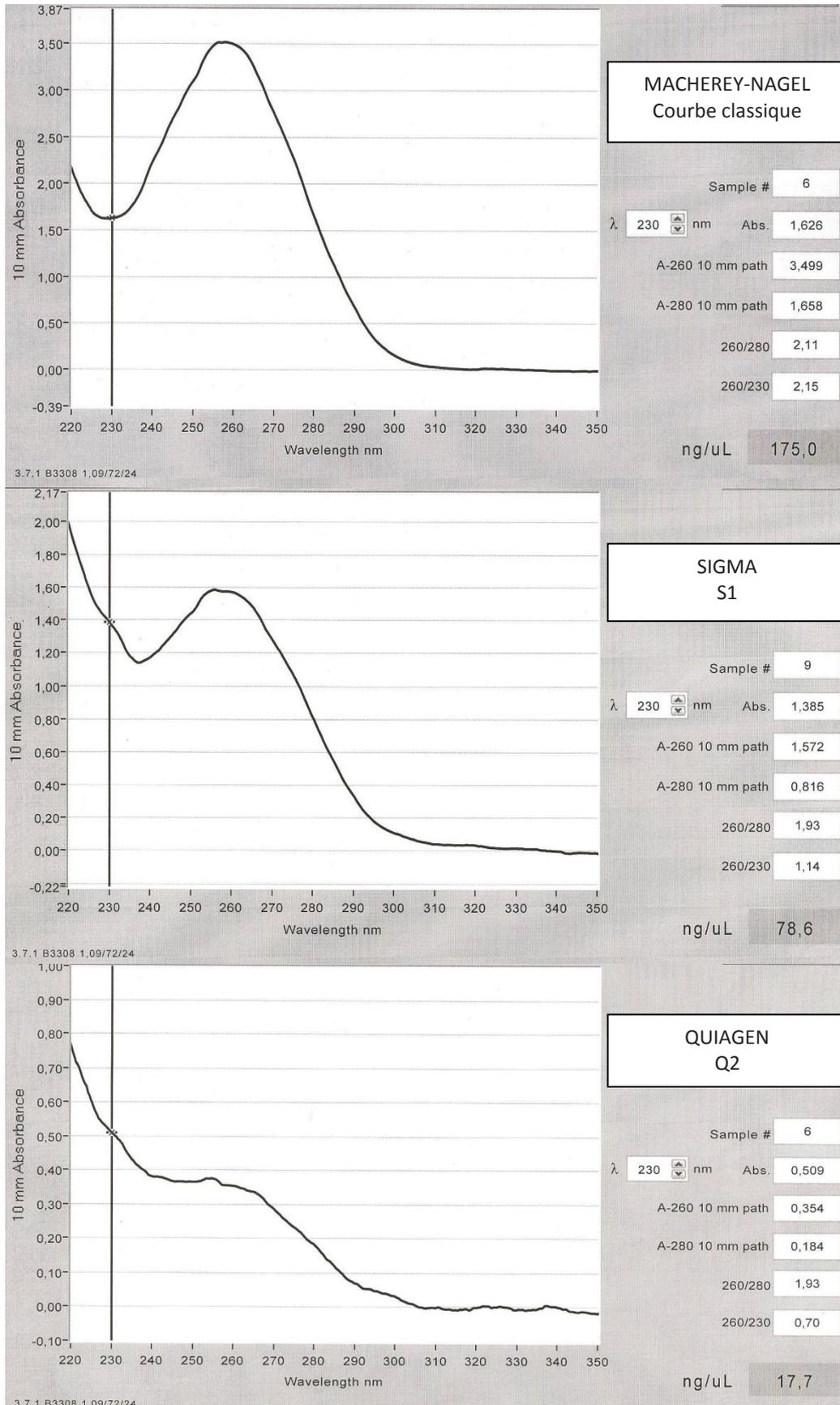
ANNEXE 7

Séquence de bases azotées



ANNEXE 9

ABSORBANCE D'UNE EXTRACTION AVEC CHAQUE KIT



BIBLIOGRAPHIE

- Hewitt, G.M. (1999),
Post-glacial re-colonization of European biota.
Biological Journal of the Linnean Society, 68, 87–112.
- Hewitt, G.M. (2004)
Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary.
Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 359, 183–195.
- DeChaine, E.G. & Martin, A.P. (2005)
Historical biogeography of two alpine butterflies in the Rocky Mountains: broadscale concordance and local-scale discordance.
Journal of Biogeography, 32, 1943–1956.
- Schmitt, T. (2007)
Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends.
Frontiers in Zoology, 4, 11.
- Hewitt GM
The structure of biodiversity – insights from molecular phylogeography,
Frontiers in Zoology 2004, 1:4
- Ibrahim KM, Nichols RA & Hewitt GM (1996).
Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion.
Heredity, 77, 282–291
- Médail, F. & Diadema, K. (2009)
Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin.
Journal of Biogeography, 36, 1333–1345.
- Kerdelhue', C., Zane, L., Simonato, M., Salvato, P., Rousselet, J., Roques, A. & Battisti, A. (2009)
Quaternary history and contemporary patterns in a currently expanding species.
BMC Evolutionary Biology, 9, 220.