

A l'attention de

Christophe DUCHAMP
ONCFS
Micropolis
F05000 GAP
christophe.duchamp@oncfs.gouv.fr

Référence : 2017/UB ER02/n° 06

L'ONCFS souhaite réaliser des analyses génétiques à partir d'échantillons dégradés de loups (excréments, poils, urine, sang, tissus) afin de déterminer l'espèce, la lignée génétique et l'empreinte génétique individuelle.

Problématique

Depuis 1995, l'ONCFS réalise un suivi génétique du Loup (*Canis lupus lupus*) en France à l'aide d'un échantillonnage non-invasif et du génotypage de marqueurs génétiques, permettant ainsi de modéliser la dynamique démographique de cette espèce.

Depuis 15 ans, le laboratoire ANTAGENE a développé une expertise reconnue au niveau international dans les analyses génétiques chez les animaux domestiques et sauvages, et notamment dans l'analyse des traces d'ADN présentes dans les prélèvements non-invasifs (crottes, poils, etc).

Le laboratoire ANTAGENE a mis au point un panel de 22 marqueurs microsatellites permettant d'assurer la compatibilité avec les empreintes génétiques produites depuis 1995 (6 marqueurs), de disposer d'une empreinte génétique individuelle beaucoup plus informative et d'apporter des informations complémentaires sur le niveau d'hybridation. ANTAGENE détermine également l'espèce, la lignée génétique au niveau de l'ADN mitochondrial et le sexe moléculaire.

Dans le cadre d'une mise en concurrence publique, l'ONCFS a retenu le laboratoire ANTAGENE pour réaliser, dans des délais courts, les analyses génétiques des échantillons de loups du 1^{er} semestre 2017. L'actualisation des connaissances au niveau semestriel est en effet requise dans les plans de gestion nationaux de l'espèce et pour répondre aux différentes urgences d'expertises de nouveaux secteurs de présence, d'expertise territoriales ou de requêtes ministérielles et préfectorales.

Des échantillons d'excréments, de poils, d'urine, de sang et de quelques tissus sur les animaux morts sont recueillis en continu par un réseau de correspondants piloté par l'ONCFS. Le suivi démographique des animaux repose alors principalement sur la reconnaissance individuelle des animaux sur la base de leur empreinte génétique (combinaison unique de marqueurs microsatellites).

Méthodes

Les méthodes d'analyses génétiques et d'analyses statistiques sont présentées de façon synthétique ci-dessous. Des informations plus précises concernant les protocoles, les infrastructures, les équipements, l'équipe et les compétences sont fournies en Annexes B et C.

Le laboratoire ANTAGENE dispose d'installations modernes et d'équipements à la pointe de la technologie pour réaliser tout type d'analyses génétiques chez les animaux, avec une forte expertise dans le domaine des marqueurs microsatellites et des ADN dégradés.

Le laboratoire est configuré pour analyser les échantillons collectés de façon classique ou de façon non-invasive (ADN trace) afin d'éviter les risques de contamination croisée entre échantillons et de garantir la traçabilité et la qualité des résultats produits.

Les principales précautions prises (se référer aux Annexes B et C pour plus de détails) :

- Les échantillons sont préparés dans une pièce spéciale.
- L'extraction et purification d'ADN est réalisée en présence de témoins négatifs d'extraction afin de confirmer l'absence de toute contamination lors de la préparation des échantillons et de l'extraction d'ADN.
- Les réactifs (enzymes, amorces d'ADN...) utilisés pour l'amplification des marqueurs génétiques sont préparés dans une zone ultra-propre en surpression accessible par un sas, pour éviter toute contamination ambiante par d'éventuels ADN volatils (pre-PCR).
- Les étapes d'amplification et de migration sur séquenceur automatique d'ADN sont conduites dans une zone en dépression accessible par deux sas et avec un recyclage permanent de l'air ambiant, afin d'éviter la contamination du reste du laboratoire par des ADN amplifiés naturellement présents en grande quantité et très volatils (post-PCR).
- Les données sont pré-interprétées par un logiciel et interprétées par deux analystes de façon indépendante et en aveugle.

Le 13 juillet 2017, le laboratoire ANTAGENE a réceptionné 228 échantillons prélevés en France en provenance de l'ONCFS avec un tableau répertoriant le numéro d'identification (code ONCFS) et le type de prélèvement pour chaque échantillon, correspondant à deux séries : les 118 nouveaux échantillons pour la série dénommée « Nouveaux_2017 » et 110 échantillons de 2016 pour la série dénommée « Passerelles_2017 »

Le laboratoire ANTAGENE attribue alors un numéro d'identification unique à 6 chiffres à chaque prélèvement (le n° Antagene) et réalise le pointage des échantillons pour confirmer la conformité entre le tableau fourni et les prélèvements physiquement réceptionnés.

Les échantillons dégradés sont préparés en évitant toute contamination croisée et ambiante. Les ADN sont extraits et purifiés de manière à optimiser la concentration d'ADN et de limiter la concentration des inhibiteurs, particulièrement présents dans les matières fécales.

Les ADN sont amplifiés et séquencés dans les deux sens (forward et reverse) au niveau d'une portion de l'ADN mitochondrial, appelée région de contrôle (Vila, 1999, Randi 2000, Pires 2006) pour 118 échantillons correspondant à la série des nouveaux échantillons de l'année 2017 (Nouveaux_2017). Les séquences d'ADN obtenues sont analysées et alignées avec les séquences d'ADN de référence dans les bases de données et les articles scientifiques de référence. Ce travail bioinformatique permet de déterminer avec une fiabilité supérieure à 99% l'espèce et la lignée génétique, et notamment de confirmer si l'échantillon provient d'un loup de la lignée italienne/française. Les résultats sont délivrés sous la forme d'un tableau excel comportant le n° Antagene, le n° ONCFS, le type de prélèvement, l'espèce et la lignée obtenues par l'analyse de l'ADN mitochondrial.

Les ADN sont également amplifiés et analysés au niveau d'un panel de 22 marqueurs microsatellites spécifiquement mis au point pour le Loup (Godinho 2011, Godinho 2014, Randi 2014) et d'un marqueur de sexe (Amélogénine) génotypé en double. Chaque empreinte génétique est constituée de 24 marqueurs (22 microsatellites et le marqueur de sexe en double) ; le nom et l'origine des marqueurs sont listées en Annexe A.

Le génotypage repose sur une amplification multiplex des marqueurs grâce à la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) et sur une analyse sur séquenceur automatique d'ADN selon la technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ce qui permet d'obtenir pour chaque échantillon un électrophorégramme (fichier graphique représentant la fluorescence des marqueurs).

Le logiciel GeneMapper est calibré pour réaliser une première assignation automatique des allèles microsatellites à partir des électrophorégrammes. Deux analystes expérimentés pour la lecture des marqueurs microsatellites réalisent la lecture des génotypes, chacun de façon indépendante puis les éventuels écarts sont résolus en reprenant l'interprétation des allèles au niveau des électrophorégrammes.

Les génotypages sont répétés 4 fois selon l'approche multi-tubes afin de compenser l'absence d'amplification de certains marqueurs et de compenser les pertes alléliques inhérentes à l'amplification d'ADN dégradé (faible quantité et qualité de l'ADN). Les éventuelles différences de génotypes sont ré-examinées en reprenant les 4 électrophorégrammes de l'échantillon concerné. Pour chaque échantillon, une empreinte génétique consensus est établie en réalisant la synthèse des empreintes génétiques obtenues à chacun des 4 génotypages.

Un indice qualité est calculé pour chaque échantillon en considérant la proportion des allèles correctement génotypés sur l'ensemble des 24 marqueurs et pour les différents génotypages de cette approche multi-tubes. Pour un échantillon fortement dégradé, la proportion de marqueurs non amplifiés et de pertes alléliques (absence d'amplification d'un allèle microsatellite) est d'autant plus important que l'ADN est en faible quantité et de faible qualité, ce qui se traduira par une dégradation de l'indice qualité. A contrario, un prélèvement de très bonne qualité pourra présenter une empreinte génétique identique à chaque génotypage et donc un indice qualité de 100%. Etant donné le grand nombre de marqueurs microsatellites (22) et les analyses statistiques réalisées, nous considérons qu'une empreinte génétique consensus est exploitable

à partir d'un indice qualité de 50%, ce qui représente statistiquement une empreinte avec au moins 12 à 14 marqueurs microsatellites renseignés sur les 22 microsatellites génotypés.

Les empreintes consensus sont comparées deux à deux entre les échantillons des deux séries de 2017 (22 marqueurs microsatellites) et avec les empreintes de la base de données historique (6 marqueurs microsatellites) afin de détecter les individus préalablement identifiés génétiquement (recaptures génétiques). Pour la comparaison d'empreintes à 22 marqueurs, le logiciel est paramétré pour accepter 8 marqueurs manquants, 2 différences de génotype et un minimum de 10 marqueurs communs. Pour la comparaison d'empreintes à 6 marqueurs, le logiciel est paramétré pour n'accepter aucun marqueur manquant, 1 différence de génotype et un minimum de 6 marqueurs communs. Les résultats sont délivrés sous la forme d'un tableau qui affiche l'une en dessous de l'autre les empreintes consensus considérées comme identiques ou très proches (les écarts pouvant être liés aux pertes alléliques) et en matérialisant par des couleurs les génotypes manquants et les différences de génotype.

Afin de déterminer le niveau d'hybridation pour chaque échantillon, les empreintes consensus sont analysés à l'aide du logiciel d'inférence bayésienne Structure (Pritchard 2000, Falush 2003) en utilisant le modèle avec hybridation et fréquences alléliques corrélées. L'analyse considère 2 populations attendues (chien et loup ; $K=2$) et repose sur une populations de référence de chiens d'origine variée, incluant également des races de chien-loup (chien-loup de Sarloos, chien-loup tchécoslovaque, chien-loup américain). Les analyses consistent en un très grand nombre de simulations informatiques (longueur de burn-in de 100 000 et longueur de chaîne de Monte-Carlo de 100 000), chaque simulation étant répété 20 fois. Ces analyses statistiques permettent de déterminer la probabilité d'assignation aux deux sous-espèces de référence, le chien et le loup, et l'intervalle de crédibilité à 95% de cette probabilité. Dès lors que l'intervalle de crédibilité ne recouvre ni la borne 0 (probabilité 0%) ni la borne 1 (probabilité 100%) alors l'échantillon est considéré comme hybride (Bohling 2011). Cette méthode permet de détecter avec fiabilité des hybrides de première génération (F1) et les hybrides de deuxième génération (back-cross) mais pas au delà.

Les génotypes sont délivrés sous forme de tableau croisé (format excel) avec les échantillons en ligne et les marqueurs en colonne. Chaque ligne constitue l'empreinte génétique consensus de chaque échantillon, c'est-à-dire la combinaison des 24 marqueurs analysés, soit 22 marqueurs microsatellites et le marqueur de sexe génotypé en double.

Les tableaux de résultat comportent pour chaque échantillon : le n° Antagene, la série à laquelle appartient l'échantillon, le type de prélèvement, le n° ONCFS, éventuellement le n° d'individu ONCFS auquel est associé l'échantillon, l'espèce et la lignée obtenues à partir de l'ADN mitochondrial, l'indice qualité, le sexe moléculaire, le statut d'hybridation et 24 colonnes contenant chacune le génotype de chaque marqueur (codé sur 6 chiffres, les 3 premiers chiffres représentant le 1^{er} allèle et les 3 chiffres suivants représentant le 2^{ème} allèle du génotype d'un marqueur).

Résultats

Les résultats, transmis à l'ONCFS le 11 août 2017, comportent les données suivantes :

- l'espèce et la lignée génétique obtenues à partir de l'analyse de l'ADN mitochondrial
- les empreintes génétiques et le sexe moléculaire de chaque échantillon (22 marqueurs microsatellites et marqueur de sexe génotypé en double)
- les recaptures génétiques, c'est-à-dire les échantillons considérés comme identiques ou très proches génétiquement
- les résultats d'hybridation avec la probabilité d'assignation aux classes de référence « chien » et « loup », l'intervalle de crédibilité de cette probabilité et l'interprétation en terme d'hybridation.

Espèce et lignée génétique

Les analyses de l'ADN mitochondrial réalisées sur 118 échantillons montrent que le type mitochondrial correspond aux espèces ou sous-espèces suivantes :

Espèce (ADN mitochondrial)	Nombre
Loup (<i>Canis lupus lupus</i>)	77
Chien (<i>Canis lupus familiaris</i>)	17
Renard (<i>Vulpes vulpes</i>)	18
Non déterminée	3
Autres espèces	3
Total	118

La totalité des échantillons provenant de dépouilles correspond bien à l'espèce Loup au niveau de l'ADN mitochondrial.

Les échantillons avec un ADN mitochondrial de type Loup présentent tous un sous-type mitochondrial associée à la lignée génétique italienne, à l'exception de 3 échantillons pour lesquelles la lignée génétique n'a pas pu être déterminée.

Empreintes génétiques

Les empreintes génétiques (22 marqueurs microsatellites plus le marqueur de sexe en double) ont été établies pour 207 échantillons, c'est-à-dire les 228 échantillons desquels ont été exclus les 21 échantillons présentant un ADN mitochondrial d'autres espèces.

Empreintes génétiques	Nombre
Passerelles_2017 (Loup)	110
Nouveaux_2017	
Loup	77
Chien	17
Indéterminé	3
Total empreintes	207
Nouveaux_2017	
Autres espèces	21
Total échantillons	228

Une empreinte génétique est considérée comme exploitable si l'indice qualité est bon c'est-à-dire supérieur à 0,50 ; ce qui correspond à une empreinte génétique consensus comportant un minimum de 12 à 14 marqueurs renseignés sur les 22 marqueurs microsatellites analysés.

Un total de 158 empreintes génétiques (76%) se révèlent donc exploitables.

Indice qualité (IQ)		Nombre	%
Mauvais	< 0,50	49	24%
Empreintes génétiques exploitables (IQ ≥ 0,50)		158	76%
Bon	entre 0,50 et 0,80	48	23%
Très bon	entre 0,80 et 0,95	41	20%
Excellent	≥ 0,95	69	33%
Total		207	100%

Les 3 échantillons indéterminés au niveau de l'ADN mitochondrial présentent des indices qualité très très faible ou nul. Cela est probablement lié à une absence totale d'ADN ou à un ADN de très mauvaise qualité.

Recaptures génétiques

Les analyses de recaptures génétiques (consistant à identifier des échantillons avec des empreintes génétiques identiques ou très proches) indiquent que 24 échantillons avec une empreinte exploitable (IQ \geq 0,50) correspondraient effectivement à 11 individus différents.

Même avec 4 génotypages de chaque échantillon, nous considérons qu'1 ou 2 pertes alléliques restent encore possible sur l'ensemble des 22 marqueurs microsatellites.

Recapture		Echantillons	Animaux
Certaine	Empreintes identiques	11	5
Très probable	1 perte allélique	9	4
Probable	2 pertes alléliques	4	2
Total		24	11

Le total des 158 empreintes exploitables correspondraient donc à 147 animaux différents.

Hybridation

Les analyses statistiques d'hybridation sont réalisées sur les empreintes génétiques qui présentent un indice qualité supérieur ou égal à 50% et qui présentent un minimum de 17 marqueurs renseignés sur les 22 marqueurs microsatellites analysés.

Sur les 158 empreintes génétiques exploitables avec un indice qualité supérieur ou égal à 50%, 155 échantillons répondent à ce double critère pour être utilisés pour les analyses d'hybridation.

Série	Empreintes exploitables	Empreintes non exploitables	Total
Nouveaux_2017	72	25	97
Passerelles_2017	83	27	110
Total	155	52	207

Pour chaque échantillon, les analyses statistiques d'hybridation consistent à calculer la probabilité d'assigner une empreinte génétique à un chien et l'intervalle de crédibilité à 95% de

cette probabilité, ainsi que la probabilité d'assigner une empreinte génétique à un loup et l'intervalle de crédibilité à 95% de cette probabilité. Ces probabilités et intervalles de confiance sont calculées à partir de 100 000 simulations informatiques répétées 20 fois.

Ces analyses statistiques permettent de classer chaque échantillon en Chien, en Loup ou en Hybride. Ces résultats sont croisés avec les données de l'ADN mitochondrial, en sachant que les échantillons de la série « Passerelles_2017 » n'ont pas été séquencés pour l'ADN mitochondrial dans le cadre du présent travail mais ils sont considérés comme appartenant au type mitochondrial Loup (*Canis lupus lupus*) par l'ONCFS.

Classification (en nombre d'échantillons)

	ADN mitochondrial Loup	ADN mitochondrial Chien	Total
Chien	2	11	13
Loup	132	0	132
Hybrides	9	1	10
Total	143	12	155

Ces résultats sont retraités en tenant compte des recaptures génétiques (empreintes génétiques identiques ou très proches), c'est-à-dire de différents échantillons pouvant correspondre à un même individu.

Classification (en nombre d'animaux)

	ADN mitochondrial Loup	ADN mitochondrial Chien	Total
Chien	2	11	13
Loup	120	0	120
Hybrides	9	1	10
Total	131	12	143
Sous-total Loup & Hybrides			130
% d'animaux hybrides			7,7%

En excluant les 13 individus classés dans la catégorie Chien, les 10 individus évalués comme des hybrides correspondent à une proportion de 7,7% d'animaux hybrides.

Parmi ces 10 hybrides, on distingue deux catégories :

- 2 animaux avec une probabilité d'assignation « chien » élevée (62%) qui pourraient être assimilés à des hybrides de 1^{ère} génération (chien x louve),
- 8 animaux avec une probabilité d'assignation « chien » nettement plus faible (10 à 22%) qui pourraient correspondre à des rétrocroisements (backcross) entre des hybrides et des loups, et n'étant donc pas issus de croisements directs avec des chiens.

Les échantillons F4817002 et F4817004 (prélevés dans le même département) présentent une empreinte génétique proche, mais avec tout de même 3 génotypes différents qui pourraient s'expliquer par des pertes alléliques. Si on les considérait comme issu d'un seul individu, alors le nombre d'hybrides serait de 9 au lieu de 10. Dans l'attente d'investigation complémentaire et par prudence scientifique, nous préférons considérer ces deux échantillons comme appartenant à deux individus différents très proches génétiquement.

Il faut noter que deux individus classés dans la catégorie Chien présentent un ADN mitochondrial de type Loup. Ces individus peuvent posséder un ancêtre provenant d'une race de chien-loup dont certains ont conservés un ADN mitochondrial de type Loup ou d'une hybridation naturelle ancienne ayant pu se produire chez leurs ascendants même lointains. L'ADN mitochondrial ne se dilue pas et est transmis quasiment à l'identique par la lignée maternelle.

Presque tous les hybrides (sauf un) présentent un ADN mitochondrial de type Loup. D'un point de vue biologique, on s'attend effectivement davantage à des croisements entre un chien mâle errant et une louve (éventuellement isolée) qui va élever les louveteaux hybrides comme des loups et qui va transmettre à 100% de sa descendance mâle et femelle un ADN mitochondrial de type Loup.

L'hybride présentant un ADN mitochondrial de type Chien proviendrait d'un croisement entre un loup mâle et une chienne. L'éducation d'un tel hybride par une chienne et l'intégration dans les populations naturelles de loups pourraient se révéler difficile étant données les différences comportementales entre les deux sous-espèces.

Guillaume QUENEY
Docteur en Génétique



Références bibliographiques

- Bannasch DL, Bannasch MJ, Ryun JR, Famula TR, Pedersen N (2005) Y chromosome haplotype analysis in purebred dogs. *Mammalian Genome*, 16, 273-280.
- Bohling JH, Waits LP (2011) Assessing the prevalence of hybridization between sympatric *Canis* species surrounding the red wolf (*Canis rufus*) recovery area in North Carolina, *Molecular Ecology*, 20-10, 2142-2156
- Bohling JH, Adams JR, Waits LP (2013) Evaluating the ability of Bayesian clustering methods to detect hybridization and introgression using an empirical red wolf data set, *Molecular Ecology*, 22-1, 74-86
- Fabbri E, Caniglia R, Kusak J, Galov A, Gomercic T, Arbanasic H, Huber D, Randi E (2014) Genetic structure of expanding wolf (*Canis lupus*) populations in Italy and Croatia, and the early steps of the recolonization of the Eastern Alps, *Mammalian Biology*, 79-2, 138-148
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587
- Godinho R, Llaneza L, Blanco JC, Lopes S, Alvares F, Garcia EJ, Palacios V, Cortes Y, Talegon J, Ferrand N (2011). Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, 20, 5154-5166
- Godinho R, Lopez-Bao JV, Castro D, Llaneza L, Lopes S, Silva P, Ferrand N (2014). Real-time assessment of hybridization between wolves and dogs: combining non-invasive samples with ancestry. *Molecular Ecology Resources*, 15, 317-328
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23, 1801-6
- Miquel C, Bellemain E, Poillot C (2006) Quality indexes to assess the reliability of genotypes in studies using noninvasive sampling and multiple-tube approach, *Molecular Ecology*, 6-4, 985-988
- Pires AE, Ouragh L, Kalboussi M, Matos J, Petrucci-Fonseca F, Brudford MW (2006) Mitochondrial DNA sequence variation in Portuguese native dog breeds: diversity and phylogenetic affinities, *Journal of Heredity*, 4, 318-330
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155, 945-959

Randi E, Lucchini V, Christensen MF, Mucci N, Funk SM, Dolf G, Loeschcke V (2000) Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization, *Conservation Biology*, 14, 464-473

Randi E, Lucchini V (2002) Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation, *Conservation Genetics*, 3-1, 29-43

Randi E (2008) Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives, *Molecular ecology*, 17-1, 285-293

Randi E, Hulva P, Fabbri E, Galaverni M, Galov A, Kusak J, Bigi D, Bolfikova BC, Smetanova M, Caniglia R (2014) Multilocus detection of wolf x dog hybridization in Italy, and guidelines for marker selection, *PLoS ONE* 9(1)

Sundqvist A-K, Ellegren H, Olivier M, Vila C (2001) Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 10, 1959-1966

Thalmann, O., Shapiro, B., Cui, P., et al. (2013). Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs. *Science* 342 (6160), 871-874

Vila C, Amorim IR, Leonard JA, Posada D, Castro-Viejo J, Petrucci-Fonseca F, Crandall KA, Ellegren H, Wayne RK (1999) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf. *Canis lupus*. *Molecular Ecology*, 8, 2089-2103

Annexe A

Liste des 24 marqueurs
(dont 22 marqueurs microsatellites)

Marqueur (ordre empreinte)	Origine
AMEL-A	Sexe
AMEL-B	Sexe
AHT103	Hybridation
AHT111	Hybridation
AHTk211	Hybridation
FH2096	ONCFS
CPH02	Europe
FH2088	Europe
C09.173	Hybridation
CPH05	Europe
FH2004	Europe
CFX30371	Hybridation
C22.279	Hybridation
C09.250	Europe
FH2161	ONCFS
FH2140	ONCFS
INU030	Hybridation
FH2137	ONCFS
FH2054	ONCFS
C27.442	Hybridation
Dbar1	Hybridation
REN162C04	Hybridation
PEZ17	ONCFS
FH2010	Hybridation

ONCFS = 6 marqueurs utilisés historiquement pour le suivi génétique des loups

Europe = marqueurs complémentaires utilisés par l'ONCFS pour comparer avec l'Italie et la Suisse

Hybridation = marqueurs discriminants entre le chien et le loup et augmentant la capacité de détection des hybrides

Annexe B

Méthodes

Les principales étapes :

- extraction/purification de l'ADN
- séquençage de l'ADN mitochondrial
- génotypage des marqueurs microsatellites
- lecture des génotypes microsatellites
- analyses bioinformatiques et biostatistiques
- interprétation des résultats

1. Extraction/purification d'ADN

Les échantillons classiques (tissus, sang, frottis buccaux, etc) sont traités dans une pièce spécifique.

Les échantillons dégradés, contenant de l'ADN en faible quantité (poils, fèces, etc) sont traités dans une pièce spéciale dédiée à l'exploitation des ADN traces (échantillons contenant de l'ADN en faible quantité).

Cette pièce est sous UV afin de détruire les éventuels ADN contaminants, est nettoyée à l'eau de javel après chaque expérience et dispose d'un extracteur d'air pour éviter toute contamination ambiante et toute contamination croisée entre échantillons.

Une fraction de chaque échantillon est lysée et l'ADN est extrait et purifié à l'aide de colonnes constituées d'une matrice échangeuse d'ions (Macherey-Nagel). Cette méthode permet d'obtenir un ADN pur (débarassé des protéines, lipides, molécules inhibitrices, etc) et autorise ensuite l'amplification des marqueurs génétiques et le séquençage de l'ADN avec la meilleure qualité possible. La purification de l'ADN limite la quantité des molécules inhibitrices présentes dans les échantillons, et notamment dans les matières fécales, et qui perturberaient l'amplification des marqueurs génétiques.

L'extraction d'ADN est réalisée en présence de témoins négatifs d'extraction afin de confirmer l'absence de toute contamination lors de la préparation des échantillons et de l'extraction des ADN.

2. Séquençage et analyse de l'ADN mitochondrial

Une portion de l'ADN mitochondrial est amplifiée et séquencé dans les deux sens (forward et reverse) en utilisant les amorces d'amplification de référence adaptées aux espèces ou groupes d'espèces étudiées.

Les réactions de séquence sont analysées sur un séquenceur automatique d'ADN (ABI 3130xl, Applied Biosystems). Les séquences d'ADN obtenues sont lues, nettoyées, alignées entre elles et comparées aux séquences de référence, à l'aide de plusieurs logiciels informatiques dédiés à l'analyse et à l'alignement de séquences d'ADN.

3. Génotypage des marqueurs microsatellites

Les marqueurs microsatellites sont amplifiés en utilisant des couples d'amorces spécifiques, chaque couple comportant une amorce fluorescente et une amorce classique. Ces marqueurs microsatellites sont amplifiés en une ou plusieurs réactions multiplex à l'aide de thermocycleurs et sont analysés sur séquenceur automatique d'ADN (ABI 3130xl, Applied Biosystems) selon la technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

Les amorces oligonucléotidiques sont conçues et adaptées pour optimiser l'amplification et la lecture des marqueurs microsatellites. L'utilisation de queues poly-A et de queues pig-tails sur les amorces permet d'analyser plusieurs marqueurs microsatellites en une seule migration et d'améliorer grandement la qualité des génotypes.

Les réactifs (enzymes, amorces d'ADN...) utilisés pour l'amplification des marqueurs génétiques sont préparés dans une zone ultra-propre en surpression accessible par un sas, pour éviter toute contamination ambiante par d'éventuels ADN volatils (étape pré-PCR).

Les étapes d'amplification et de migration sur séquenceur automatique d'ADN sont conduites dans une zone en dépression accessible par deux sas et avec un recyclage permanent de l'air ambiant, afin d'éviter la contamination du reste du laboratoire par des ADN amplifiés naturellement présents en grande quantité et très volatils (étape post-PCR).

4. Lecture des génotypes microsatellites

Le logiciel d'analyse du séquenceur automatique d'ADN (GeneMapper) est calibré pour définir les catégories d'allèles de chaque marqueur. Cette calibration est réalisée de façon à garantir une nomenclature des allèles conforme aux données publiées des marqueurs microsatellites et des échantillons déjà présents dans les bases de données.

Pour chaque échantillon et pour chaque marqueur, le logiciel pré-interprète les génotypes obtenus. Deux analystes expérimentés pour la lecture des marqueurs microsatellites réalisent la lecture des génotypes, de façon indépendante et en aveugle. Les deux lectures indépendantes sont confrontées. Toute différence non résolue est transformée en donnée manquante. Cette méthode très rigoureuse de lecture permet de limiter les erreurs de génotypage, les faux allèles et les artefacts et permet ainsi de garantir une fiabilité supérieure à 99% des génotypes microsatellites.

Les génotypes sont délivrés sous forme de tableau croisé (format excel) avec les échantillons en ligne et les marqueurs en colonne.

Annexe C

Laboratoire (infrastructures, équipements, équipe, compétences)

ANTAGENE a mis en place, en 2012, un nouveau laboratoire de 500 m² à la pointe de la technologie, avec les installations et les équipements les plus modernes qui permettent d'assurer la production de données génétiques avec des délais courts et un très haut niveau de qualité.

Le laboratoire a été conçu et est configuré pour éviter les risques de contamination croisée entre les échantillons analysés et pour garantir la traçabilité et la qualité des résultats produits.

La laboratoire s'appuie sur :

- sur une équipe permanente, stable et rigoureuse de chercheurs, d'ingénieurs et de techniciens supérieurs
- sur des procédures qualité strictes
- sur des contrôles qualité permanents de la réception des échantillons à la transmission des données génétiques produites
- sur un système informatique (LIMS) développé spécifiquement
- sur une gestion des flux avec une marche en avant et des pièces dédiées à chaque étape du process de traitement des échantillons et des ADN
- sur des zones en surpression et dépression pour empêcher la contamination des réactifs et des échantillons traités au laboratoire.

Le laboratoire a mise en place un système de management de la qualité reconnu par une certification ISO 9001.

La démarche qualité d'ANTAGENE se traduit par :

- une fiabilité des résultats supérieure à 99%
- une traçabilité sans faille de la commande aux résultats
- une amélioration permanente des délais
- une information technique et scientifique précise
- la qualité de ses prestations et de ses services.

1. Infrastructures et équipements

Les analyses génétiques au laboratoire repose sur la technique de génétique moléculaire appelée PCR pour Polymerase Chain Reaction (ou polymérisation en chaîne de l'ADN).

La technique de PCR est très sensible aux contaminations ambiantes entre échantillons et requiert donc des processus extrêmement rigoureux et un environnement contrôlé pour garantir la fiabilité des résultats.

Pour prévenir ces contaminations ambiantes et contaminations croisées, le laboratoire est dédié à l'analyse de l'ADN avec une gestion des flux et une marche en avant rigoureuse constituée de différentes pièces réservées pour chaque étape de traitement des échantillons :

- préparation des prélèvements (tissu, sang, fèces, etc)
- extraction et purification de l'ADN
- stockage de l'ADN
- préparation des mélanges réactionnels (zone en surpression ultra-propre)
- assemblage des ADN et des mélanges réactionnels (pré-PCR)
- amplification et analyse des ADN (zone en dépression, post-PCR)
- lecture et validation des données génétiques produites
- analyses bioinformatiques et statistiques.

Le laboratoire installé par ANTAGENE repose sur ces principes en conformité avec les normes AFNOR NF XP U47-600-1 et 600-2 (Exigences et recommandations pour la mise en œuvre, le développement et la validation de la PCR en santé animale) :

- une marche en avant : les échantillons sont gérés par des techniciens dans des pièces dédiées à chacune des étapes sans jamais revenir en arrière de la préparation initiale des échantillons jusqu'aux analyses génétiques finales de l'ADN, en passant par l'extraction de l'ADN, le stockage de l'ADN, la préparation des mélanges réactionnels et l'amplification de l'ADN,
- des zones de travail séparées pour chaque étape et avec leur propre équipements, appareils, consommables et réactifs,
- une gestion des flux : des règles et procédures précises sont définies pour gérer les flux des prélèvements, des échantillons d'ADN, des réactifs et des consommables de laboratoire, des personnes (avec port de chaussures de laboratoire et de blouses dédiées aux zones de travail),
- une zone en surpression et une zone en dépression avec un renouvellement d'air indépendant et permanent, pour contrôler le niveau de contamination ambiante de l'air et pour protéger les réactifs et les échantillons.

Le laboratoire et les différentes zones de travail sont organisés de la façon suivante :

- une pièce pour traiter les prélèvements dès leur réception,
- une pièce pour préparer les prélèvements classiques, les frottis buccaux, les échantillons de sang, de tissus, de semence, etc
- une pièce pour préparer les prélèvements d'échantillons dégradés (ADN trace) tels que les poils, excréments, fèces, urine, etc
- deux pièces pour réaliser l'extraction d'ADN avec des plateformes dédiées semi-automatisées et automatisées,
- une grande pièce pour stocker l'ADN dans des congélateurs à -20°C (dans des plaques de 96 tubes),
- une zone en surpression (pression positive permanente de l'air, renouvellement d'air indépendant et zone accessible par un sas d'entrée/sortie) garantissant un espace de travail ultra-propre pour préparer les réactifs et les mélanges réactionnels très sensibles, nécessaires à l'amplification de l'ADN,

- plusieurs pièces en atmosphère confinée pour assembler l'ADN et les mélanges réactionnels (travail manuel et automatisé), correspondant à l'étape « pré-PCR » (avant amplification de l'ADN),
- une grande zone en dépression (pression négative permanente de l'air, renouvellement d'air indépendant et zone accessible par un sas d'entrée et un autre sas d'entrée/sortie) garantissant un renouvellement permanent de l'air et équipée avec des thermocycleurs, analyseurs et séquenceurs d'ADN, correspondant à l'étape post-PCR (après amplification de l'ADN) ; la pression négative permet de garder en permanence dans cette zone les ADN amplifiés très volatils et pour empêcher les contaminations des échantillons dans le reste du laboratoire, surtout durant les étapes d'extraction d'ADN et d'amplification de l'ADN.

Outre les installations, ANTAGENE dispose d'équipements spécialisés :

- plateformes d'extraction d'ADN
- automates
- thermocycleurs pour l'amplification de l'ADN
- analyseurs d'ADN
- séquenceur automatique d'ADN (modèle ABI 3130xl, Applied Biosystems)
- plateformes informatiques avec logiciels expert et logiciels d'analyses.

Ces équipements de génétique moléculaire et d'informatique bénéficient d'une calibration permanente et d'une maintenance spécifique pour garantir la haute qualité des données produites.

Les techniciens supérieurs et ingénieurs disposent d'une formation spécifique pour faire fonctionner en continu et assurer l'entretien de ces équipements dans les meilleures conditions.

2. Equipe et compétences

ANTAGENE déploie, depuis 15 ans, une expertise très pointue dans les technologies de l'ADN et plus particulièrement dans les domaines de la génétique moléculaire, de la génomique animale, de la bio-informatique, de la génétique des populations et de l'étude de la biodiversité des espèces animales.

Cette expertise reconnue internationalement repose sur les compétences et savoir-faire d'une équipe hautement qualifiée de techniciens supérieurs, d'ingénieurs, de chercheurs, de biostatisticiens et de généticiens des populations, en relation permanente avec les meilleures équipes de recherche dans le monde.

ANTAGENE conduit des programmes de recherche et réalise des analyses génétiques chez de nombreuses espèces animales (vertébrés et invertébrés) telles que : lapin, lièvre européen, lièvre variable, perdrix rouge, cerf, mouflon, sanglier, mouflon, chevreuil, chamois, chat forestier, loup, fouine, martre, blaireau, loutre, chauve-souris, papillons, libellules, etc.

ANTAGENE possède une grande expérience dans le développement, le génotypage et l'analyse des marqueurs génétiques, notamment l'ADN mitochondrial, les marqueurs microsatellites et les marqueurs SNP.

L'équipe d'ANTAGENE contribue à améliorer les techniques d'analyse de l'ADN et les méthodes statistiques d'analyse des données génétiques et des populations sauvages.

Le laboratoire ANTAGENE a développé une forte compétence dans l'optimisation moléculaire et le multiplexage des panels de marqueurs génétiques afin de maximiser la qualité et la fiabilité des données génétiques produites.

ANTAGENE travaille avec de nombreux organismes académiques (Universités, CNRS, INRA...) et gestionnaires de la faune sauvage (ONCFS, Fédérations de chasseurs, Collectivités Territoriales, Parcs, Réserves...)

L'équipe scientifique et technique est constituée :

- d'une directrice de la recherche et du développement (R&D)
- d'une directrice de la production et du laboratoire
- d'ingénieurs en charge des projets
- de techniciens supérieurs en charge des analyses génétiques au laboratoire
- d'analystes en charge de la lecture et de l'interprétation des données génétiques