

**AMÉLIORATION DES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION MOLÉCULAIRES DES RAVAGEURS POUR
RÉPONDRE AUX BESOINS EN DIAGNOSTIC DU SECTEUR AGRICOLE DANS LE CONTEXTE DES
CHANGEMENTS CLIMATIQUES**

PV-3.2-DP-IRDA-10

DURÉE DU PROJET : 09-2015/09-2017

RAPPORT FINAL

Réalisé par :

Alessandro Dieni, M. Sc., IRDA
Annabelle Firlej, Ph. D., IRDA

En collaboration avec :

Franz Vanoosthuyse, M. Sc., IRDA
Daniel Cormier, Ph. D., IRDA
Jean-Philippe Légaré, M. Sc. MAPAQ
Geneviève Labrie, Ph. D., CEROM

30 septembre 2017

Les résultats, opinions et recommandations exprimés dans ce rapport émanent de l'auteur ou des auteurs et n'engagent aucunement le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.

AMÉLIORATION DES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION MOLÉCULAIRES DES RAVAGEURS POUR RÉPONDRE AUX BESOINS EN DIAGNOSTIC DU SECTEUR AGRICOLE DANS LE CONTEXTE DES CHANGEMENTS CLIMATIQUES

PV-3.2-DP-IRDA-10

RÉSUMÉ DU PROJET

Avec les changements climatiques, des ravageurs des cultures seront favorisés, certains auront plus de générations, d'autres agrandiront leur aire de répartition alors que des insectes exotiques s'établiront sur le territoire québécois. Certains groupes de ravageurs sont difficiles à identifier de manière traditionnelle et nécessitent une approche axée sur la biologie moléculaire. Cependant les bases de données publiques référençant les séquences ADN des espèces détiennent peu de séquences des ravageurs québécois. Afin que le secteur agricole et le milieu scientifique puissent faire face aux changements climatiques, ce projet a pour objectif d'identifier par analyses moléculaires (codage à barres=barcodes) les ravageurs présents dans la Collection d'insectes du Québec (CIQ) et dont les séquences ADN québécoises sont absentes des bases de données publiques (National Center for Biotechnology Information (NCBI)). Vingt-cinq familles de ravageurs ont été spécifiquement ciblées pour cet exercice étant donné leur difficulté d'identification avec les méthodes traditionnelles taxonomiques. Au total, 572 pattes de spécimens ont été prélevées dans la CIQ afin d'obtenir 313 nouveaux barcodes québécois à intégrer dans NCBI. Soixante-sept barcodes ont également un potentiel de dépôt dans NCBI mais seront à analyser au cas par cas. Un échantillonnage durant l'été 2016 a permis de collecter des spécimens frais dans différents secteurs de culture et de valider les barcodes des spécimens de la CIQ lors de l'interrogation des bases de données.

OBJECTIFS ET APERÇU DE LA MÉTHODOLOGIE

L'objectif général du projet était d'améliorer les techniques de dépistage moléculaire pour le secteur agricole afin de faire face aux changements climatiques. Plus spécifiquement, le projet visait à : 1- cibler les ravageurs d'intérêts présents dans la CIQ n'ayant pas de barcodes d'origine québécoise dans les bases de données publiques; 2- analyser la région barcode des spécimens identifiés afin d'enrichir les bases de données publiques; 3- valider la technique moléculaire avec des spécimens récoltés sur le terrain. Pour le 1^{er} objectif, le projet ciblait initialement cinq familles d'insectes ravageurs pour lesquels des barcodes étaient pertinents à obtenir. Cependant, suite à une concertation de l'équipe, des familles ont été ajoutées pour aboutir à 25 familles ciblées. Nous avons procédé à une révision des noms et synonymes des espèces présentes dans les groupes de ravageurs ciblés, ainsi qu'une vérification des barcodes présents sur les plateformes de BOLD (www.boldsystems.org) et NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). De préférence, les espèces de la CIQ n'ayant pas de références génétiques en provenance du Québec, et dont plus de trois spécimens étaient présents dans la CIQ ont été ciblés. Jusqu'à cinq spécimens de régions distinctes (si cela était possible) par espèce furent sélectionnés afin de leur prélever une patte pour l'extraction d'ADN. Pour le 2^{ème} objectif, plusieurs paires d'amorces ADN ont été testées afin d'augmenter le taux de succès de séquençage des spécimens de la CIQ et trois stratégies d'amplifications ont été élaborées. Toutes les pattes de spécimens de la CIQ ont été analysées via une stratégie conservative d'amplification « overlap + nested PCR ». La méthode de prélèvement des pattes pour l'échantillonnage ainsi que tous les protocoles d'extraction ADN, amplification standard, amplification nichée, électrophorèse, envoi au séquençage et analyse de séquence par le logiciel Geneious ont été créés lors du projet et sont fournis dans les annexes de 1 à 6. Pour le 3^{ème} objectif, un échantillonnage intensif de spécimens a été réalisé en 2016 sur plusieurs sites pendant près de onze semaines (2 bleuetières, 2 vignobles, 2 vergers de pommes) et sur de multiples parcelles de recherche de l'IRDA. Des spécimens d'Elateridae ont été récoltés via plusieurs projets de recherche du CÉROM et des Pentatomidae ont été récoltés via le RAP. Sur ces échantillonnages, environ 250 spécimens ont été ciblés et leur ADN séquencé via une stratégie d'amplification standard.

Les séquences obtenues ont été analysées avec NCBI et la base de données de la CIQ pour vérifier que les barcodes générés par le projet venaient enrichir les bases de données publiques.

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS OBTENUS

Objectif 1 : Cibler les ravageurs d'intérêts présents dans la CIQ n'ayant pas de séquences génétiques québécoises dans les bases de données publiques.

Tel que résumé dans le tableau 1, le projet a permis de prélever 572 pattes d'insectes ravageurs à analyser parmi 25 familles ciblées au sein de cinq ordres d'insectes. La liste complète des espèces retenues est présentée à l'annexe 7.

Tableau 1 : Sommaire des familles d'insectes ciblés et dont les pattes ont été prélevées pour analyse de barcodes.

Familles et nombre de spécimens utilisés pour l'extraction d'ADN										
Hemiptera	77	Coleoptera	420	Hymenoptera	40	Diptera	30	Orthoptera	5	Total général=572
Acanthosomatidae	5	Buprestidae	24	Argidae	6	Agromyzidae	5	Acrididae	4	
Cicadellidae	16	Chrysomelidae	27	Diprionidae	3	Cecidomyiidae	7	Gryllidae	1	
Coreidae	7	Curculionidae	155	Siricidae	17	Tephritidae	5			
Lygaeidae	5	Dryophthoridae	8	Tenthredinidae	14	Tipulidae	13			
Miridae	13	Elateridae	134							
Pentatomidae	20	Nitidulidae	26							
Rhopalidae	5	Scarabeidae	46							
Tingidae	6									

Suite à une requête du programme, le projet a tenté d'obtenir des barcodes d'insectes exotiques non présents au Québec. Pour cela, l'équipe a ciblé la liste des espèces exotiques envahissantes à risque identifiées dans deux projets IRDA (PV-3.2-DP-IRDA-9) et CEROM (PV-3.2-DP-CÉROM-5). Un total de 229 insectes dans le projet CEROM et 65 dans le projet IRDA ont été retenus pour lesquelles le nombre de séquences barcodes présentes dans NCBI ont été recherchées. Sur les 294 espèces, 20 n'avaient aucune référence barcode et une liste de personnes contacts a été dressée pour obtenir cinq spécimens de chacune de ces espèces (Annexe 8). Cependant aucune réponse positive n'a été reçue et nous n'avons pu obtenir les barcodes de ces spécimens.

Objectif 2 : Analyser la région barcode des spécimens identifiés dans la CIQ afin d'enrichir les bases de données publiques.

Dans l'optique d'obtenir des barcodes des 572 spécimens de la CIQ, nous avons testé sept paires d'amorces et trois stratégies d'amplification (Fig. 1). La stratégie « Standard » utilise une paire d'amorces qui génère une séquence d'ADN de 648 paires de bases (pb) de la région barcode. La stratégie « Overlap » utilise deux paires d'amorces plus courtes (300 à 450 pb) qui se chevauchent pour couvrir la région barcode et elle permet d'amplifier plus facilement de l'ADN dégradé en plusieurs fragments (situation fréquente chez des spécimens entreposés à long terme dans des collections). La stratégie « Overlap + Nested PCR » utilise deux paires d'amorces plus courtes, et implique une ré-amplification de l'ADN avec d'autres paires d'amorces lorsque l'ADN des échantillons est dégradé et en très faible concentration. Les résultats préliminaires ont montré que le choix d'amorces importe peu pour les jeunes spécimens puisque le pourcentage de séquence de bonne qualité est de 100% pour quasi toutes les paires testées. Chez les vieux spécimens, nous avons de 0% de réussite (stratégie « Standard ») à 40% (stratégie « Overlap » et « Overlap + Nested PCR »). La stratégie « Standard » est moins efficace que les deux autres stratégies dans ce cas. En effet, dans les spécimens de la CIQ, la figure 2 montre que la longueur moyenne des séquences obtenues diminue en fonction de l'âge des spécimens. Pour l'analyse des spécimens de la CIQ, nous avons donc priorisé l'utilisation de la stratégie « Overlap + Nested PCR » mais qui impliquait de réaliser quatre amplifications différentes pour obtenir deux séquences consensus à assembler en vue de former un barcode (le séquençage dans les deux sens aboutis à l'obtention de quatre segments au final) (Fig. 3).

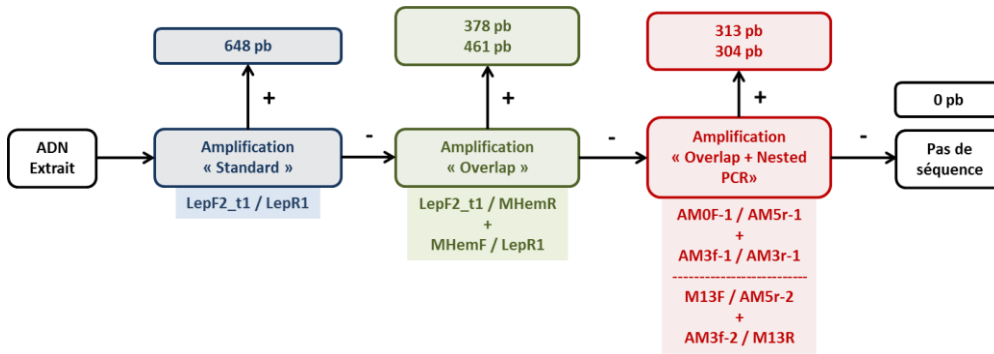


Figure 1 : Présentation des différentes stratégies d'amplification PCR.

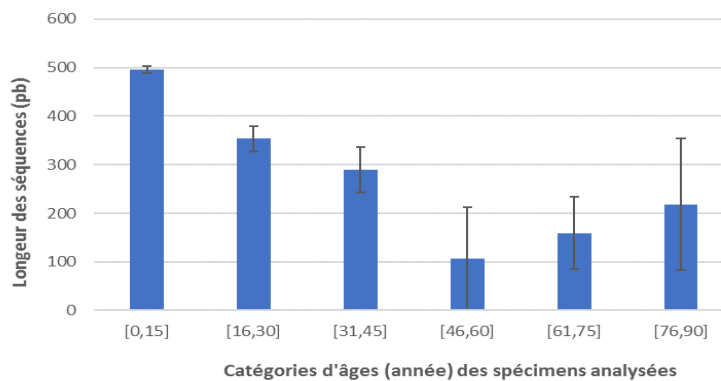


Figure 2 : Longueur des séquences obtenues en fonction de l'âge des spécimens (pb=paire de bases).

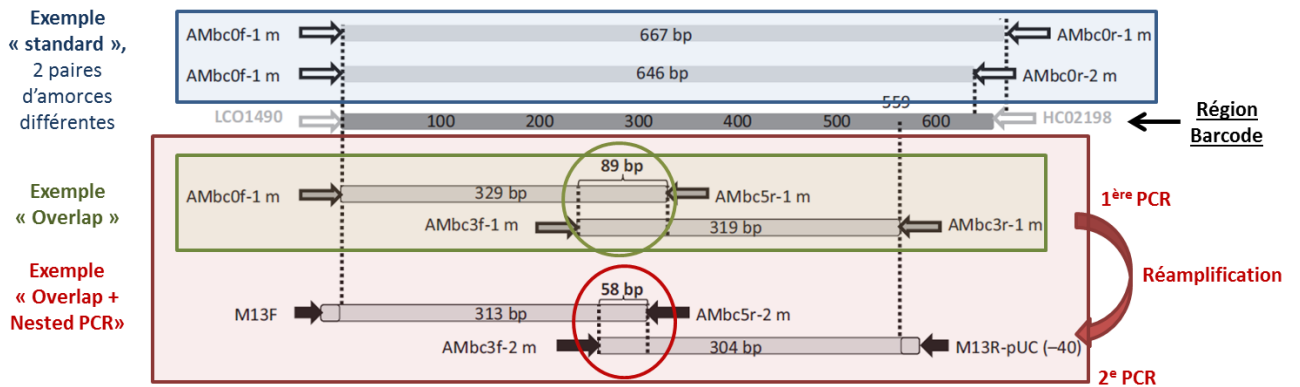


Figure 3 : Schématisation des trois stratégies d'amplifications testées : la stratégie «Standard » en bleu, la stratégie « Overlap » en vert et la stratégie « Overlap + Nested » PCR en rouge. Les cercles représentent les zones de chevauchement entre deux paires d'amorces. La bande grise entre LCO1490 et HCO2198 représente la région barcode (gène COI) de 648 pb.

Sur les 572 spécimens analysés de la CIQ, nous avons obtenues 381 barcodes potentiels. L'interrogation de la base NCBI avec ces barcodes potentiels a permis d'obtenir trois cas de figure (Tableau 2) :

- I. Le barcode de la CIQ et le barcode se rapprochant le plus de celui-ci dans NCBI sont très similaires (similarité > 98%) et ils ont le même nom d'espèce. L'espèce en question est déjà référencée, mais le ou les barcodes référencés ne proviennent pas forcément d'un spécimen du Québec.

- II. Le barcode de la CIQ et le barcode se rapprochant le plus de celui-ci dans NCBI sont très similaires (similarité > 98%) mais **ils n'ont pas le même nom espèce**. Ceci signifie qu'il y a peut-être un problème d'identification avec le spécimen de la CIQ ou le spécimen du barcode présent dans NCBI. Ces cas sont à étudier un par un pour s'assurer de la justesse des identifications avant de soumettre les barcodes.
- III. Le barcode de la CIQ se **rapproche d'aucun barcode** dans NCBI (similarité < 98%) ou il se **rapproche d'un barcode d'une espèce non identifiée**. Ce barcode en provenance de la CIQ constitue donc une première référence pour l'espèce en question.

Ainsi sur les 572 spécimens de la CIQ, 313 nouveaux barcodes seront déposés sur NCBI (les fichiers sont en cours de production pour leur dépôt en groupe). Il est important de considérer que sur ces 314 barcodes, il s'agit en fait de 628 séquences courtes d'environ 300 pb qui ont été ensuite assemblées pour obtenir une séquence consensus de 559 pb pour devenir un barcode potentiel. Bien que la stratégie d'amplification PCR utilisée était quatre fois plus longue que prévue initialement dans le projet pour les spécimens de la CIQ, le projet a permis de s'approcher des 500 séquences initialement prévues. Il y a tout de même 191 spécimens pour lesquels nous n'avons pas été en mesure d'obtenir un barcode de qualité. Certaines familles issues de la CIQ ont généré très peu de barcodes potentiels : les Miridae (38,5 % de succès), les Acrididae (25,0 % de succès), les Cicadellidae (18,8 % de succès) et les Siricidae (11,8 % de succès). L'âge des spécimens de ces familles dans la CIQ peut être une des raisons de ce faible taux de succès, il est possible aussi qu'il y ait eu un effet « taxonomique » et que de nouvelles paires d'amorce plus spécifiques à ces familles doivent être testées.

Tableau 2 : Types de barcodes obtenus suite à une interrogation sur NCBI en fonction de la taxonomie des spécimens.

Familles classées par ordre	Nombre de spécimens	Type de séquence		
		I	II	III
Coleoptera	287	121	43	123
Buprestidae	18	3	0	15
Chrysomelidae	16	6	2	8
Curculionidae	92	40	11	41
Dryophthoridae	7	5	2	0
Elateridae	97	36	21	40
Nitidulidae	11	6	2	3
Scarabeidae	46	25	5	16
Diptera	22	8	8	6
Agromyzidae	3	0	2	1
Cecidomyiidae	5	3	0	2
Tephritidae	4	2	2	0
Tipulidae	10	3	4	3
Hemiptera	51	32	12	7
Acanthosomatidae	5	5	0	0
Cicadellidae	3	2	0	1
Coreidae	6	6	0	0
Lygaeidae	5	2	3	0
Miridae	5	3	1	1
Pentatomidae	20	14	6	0
Rhopalidae	4	0	2	2
Tingidae	3	0	0	3
Hymenoptera	19	8	4	7
Argidae	3	2	0	1
Diprionidae	2	2	0	0
Siricidae	2	2	0	0
Tenthredinidae	12	2	4	6
Orthoptera	2	1	1	0
Acrididae	1	0	1	0
Gryllidae	1	1	0	0
Total général	381	170	68	143

Objectif 3 : Valider la technique moléculaire avec des spécimens récoltés sur le terrain

Suite à un échantillonnage intensif de plusieurs sites pendant près de 11 semaines (2 bleuetières, 2 vignobles, 2 vergers de pomme), de collectes par le CEROM dans le cadre de leurs projets de recherche, de collectes sur les multiples parcelles de recherche de l'IRDA, et d'envois au RAP durant l'été 2016, nous avons pu récolter 1396 spécimens pour la validation des barcodes (Tableau 3).

Tableau 3 : Sommaire des spécimens récoltés sur le terrain en 2016.

	Chrysomelidae	Cicadellidae	Curculionidae	Elateridae	Miridae	Nitidulidae	Pentatomidae	Autres	Total
Bleuetière		35		11	2				48
Verger	13	136	89	55	41	11	438	14	797
Vignoble		6		1	2				9
CEROM				94					94
Plateforme IRDA	71	96	22	2	73	4	8	15	291
RAP							12		12
Autres sources	10	27	18	1	22	38	27	2	145
Total	94	300	129	164	140	53	485	31	1396

Sur ces 1396 spécimens récoltés, nous en avons sélectionné 266 spécimens des différentes familles ciblées par le projet (Tableau 4) pour réaliser la validation de nos séquences en provenance de la CIQ. Nous avons pris le soin d'inclure des spécimens immatures (124) et matures (142) afin de se rapprocher le plus possible de la réalité des envois au laboratoire de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ. Sur ces 266 spécimens, nous avons obtenues 141 séquences de qualité pouvant être utilisées pour la validation de la méthode. Plusieurs facteurs dont la méthode de capture, les conditions de préservations des tissus, la taille du spécimen peuvent expliquer l'absence de séquence de qualité pour plusieurs spécimens.

Tableau 4 : Sommaires des spécimens sélectionnés en fonction de leur famille, de leur stade de développement et de l'obtention d'une séquence pour l'étape de validation.

Famille	Nombre de spécimens	Stade de développement			
		Immature		Mature	
		✘	✓	✘	✓
Inconnue	2	1	1	0	0
Chrysomelidae	8	0	0	3	5
Cicadellidae	52	9	8	27	8
Curculionidae	24	0	1	17	6
Elateridae	89	5	40	22	22
Miridae	17	3	3	10	1
Nitidulidae	2	0	0	1	1
Pentatomidae	72	15	38	12	7
Total général	266	33	91	92	50

Légende : ✘ = Pas de séquence, ✓ = Obtention d'une séquence

Avec les 141 séquences de validation obtenues, nous avons réalisé une interrogation (recherche de séquences similaires) dans la base de données publiques NCBI et une interrogation dans la base de données de la CIQ (constitué des 381 barcodes obtenus à l'objectif 2) afin de valider les séquences barcodes récemment obtenues. En comparant les résultats d'identification des deux interrogations, nous arrivons à quatre cas de figures (Tableau 5) avec nos séquences de validation :

- Les bases de données NCBI et CIQ permettent d'identifier le spécimen analysé;
- La base de données NCBI permet d'identifier le spécimen analysé, mais pas celle de la CIQ;
- La base de données CIQ permet d'identifier le spécimen analysé, mais pas celle de la NCBI;
- Aucune des deux bases de données ne permettent d'identifier le spécimen analysé.

Tableau 5 : Comparaison des résultats d'identification des spécimens sélectionnés pour la validation suite à des interrogations dans les base de données de NCBI et de la CIQ.

Famille	Nombre de séquences	Type de résultat			
		A	B	C	D
		NCBI ✓ / CIQ ✓	NCBI ✓ / CIQ ✗	NCBI ✗ / CIQ ✓	NCBI ✗ / CIQ ✗
Chrysomelidae	5	2	2	0	1
Cicadellidae	16	2	10	0	4
Curculionidea	8	0	6	0	2
Elateridae	62	10	15	28	9
Miridae	4	0	4	0	0
Nititulidae	1	0	1	0	0
Pentatomidae	45	24	21	0	0
Total général	141	38	60	28	15

Légende : ✓ = Succès de l'identification du spécimen, ✗ = Échec de l'identification du spécimen

L'obtention d'une « identification » par l'une ou l'autre des bases de données a été obtenue quand nous avons observé un minimum de 97% de similarité entre la séquence de validation et le barcode le plus probable issue de l'interrogation. Il faut considérer que parmi les 60 spécimens n'ayant pas pu être identifié avec les barcodes obtenues de la CIQ (colonne B), 44 de ces spécimens sont des espèces (si l'on se fie aux résultats de NCBI) qui ne figurent pas dans la CIQ. Il est aussi intéressant de noter que les 28 spécimens identifiés par les barcodes de la CIQ (colonne C) sont tous des Elateridae.

En utilisant uniquement les spécimens figurant dans la colonne A (Tableau 5), nous avons évalué comment les barcodes issues de la CIQ se comparaient en termes de « score » d'identification par rapport aux barcodes déjà présents dans la base NCBI. Les scores généralement utilisés sont le Bit-Score, le Grade, le % de similarité entre la séquence obtenue et le barcode et le % de couverture de la séquence obtenue par rapport au barcode de la base de données. Nous observons que le % de similarité entre les résultats des données NCBI et CIQ sont très similaires, ce qui confirme la qualité de nos séquences. Les légères différences peuvent s'expliquer par de la variation génétique entre les populations, mais aussi par le faible nombre de spécimens pour une même espèce dans la base de données CIQ. En somme, moins de spécimens dans une base de données implique moins de diversité génétique, donc plus de chance d'avoir un % de similarité plus faible par rapport à une base de données avec beaucoup plus de diversité. Les % de couverture sont systématiquement plus faibles dans la base de la CIQ, car nous avons utilisé un protocole avec des paires d'amorces qui génèrent des séquences de 559 pb, alors que d'autre protocole utilisant des paires d'amorces différentes pouvant générer des séquences de 648 pb (région du cytochrome c oxidase 1 utilisé pour le barcode). Puisque la paire d'amorce LCO1490 / HCO2198 utilisée pour la validation génère des séquences de 710 pb, le % de couverture pour les séquences de la base de données CIQ ne sera jamais plus de 84%, alors que des séquences plus longues dans la base de données NCBI pourront aller jusqu'à 100%. Ainsi, il est important de considérer ce facteur en utilisant les barcodes de la CIQ, car certains programmes permettant l'identification de séquences classent les résultats en utilisant le Bit-Score et le Grade, qui sont tous deux dérivés du % de similarité et du % de couverture. Cela implique que les barcodes de la CIQ pourraient se trouver plus bas dans la liste des résultats, même s'ils ont un % de similarité plus élevé que les barcodes listés plus haut.

Tableau 7: Comparaison des scores d'identification entre les interrogations issues des bases de données NCBI et CIQ.

Espèce NCBI	Bit-Score	Grade	% Similaire	% Couvert	Espèce CIQ	Bit-Score	Grade	% Similaire	% Couvert
<i>Euschistus servus</i>	1142,35	99,8	99,8	99,84	<i>Euschistus servus</i>	944,758	91,7	99,2	84,08
<i>Euschistus tristigmus luridus</i>	1149,74	99,8	99,5	100	<i>Euschistus tristigmus luridus</i>	961,378	91,8	99,2	84,31
<i>Euschistus servus</i>	1149,74	99,8	99,5	100	<i>Euschistus servus</i>	961,378	91,8	99,2	84,31
<i>Lygus lineolaris</i>	1033,4	100	100	100	<i>Lygus lineolaris</i>	1022,32	99,8	99,6	100
<i>Euschistus tristigmus</i>	1033,4	100	100	100	<i>Euschistus tristigmus luridus</i>	1033,4	100	100	100
<i>Euschistus tristigmus luridus</i>	1033,4	100	100	100	<i>Euschistus tristigmus luridus</i>	1033,4	100	100	100
<i>Brochymena quadripustulata</i>	1162,66	98,9	99,7	98,14	<i>Brochymena quadripustulata</i>	985,385	92,2	100	84,34
<i>Acrosternum hilare</i>	1181,13	99,7	99,7	99,69	<i>Acrosternum hilare</i>	983,538	92,1	99,8	84,38
<i>Acrosternum hilare</i>	1166,36	99,8	99,8	99,84	<i>Acrosternum hilare</i>	968,765	92,1	100	84,11
<i>Hypnoidus abbreviatus</i>	1086,95	98	98,4	97,63	<i>Hypnoidus abbreviatus</i>	959,531	92	100	83,98
<i>Lygus lineolaris</i>	1157,12	99,8	99,7	100	<i>Lygus lineolaris</i>	946,605	91,8	99,6	83,95
<i>Phyllotreta striolata</i>	1014,93	100	100	100	<i>Phyllotreta striolata</i>	832,113	91	100	81,97
<i>Banasa dimiata</i>	1072,18	100	100	100	<i>Banasa dimiata</i>	883,819	91,4	99,8	82,93
<i>Acrosternum hilare</i>	1062,94	100	100	100	<i>Chinavia hilaris</i>	880,126	91,4	100	82,78
<i>Ampedus nigricollis</i>	1118,34	99,6	99,4	99,84	<i>Ampedus nigricollis</i>	959,531	92	100	83,98
<i>Euschistus servus</i>	987,231	99,9	99,8	100	<i>Euschistus servus</i>	782,253	90,2	98,9	81,56
<i>Euschistus servus</i>	160,82	99,9	99,8	100	<i>Euschistus servus</i>	944,758	91,5	98,7	84,31
<i>Phyllotreta cruciferae</i>	1157,12	100	100	100	<i>Phyllotreta cruciferae</i>	974,305	82,1	100	84,19
<i>Dalopius vagus</i>	1020,47	99,1	98,6	99,65	<i>Dalopius vagus</i>	863,506	91	99,2	82,87
<i>Dalopius vagus</i>	1020,47	99,2	98,4	100	<i>Dalopius vagus</i>	887,512	91,5	100	82,9
<i>Melanotus similis</i>	1142,35	99,9	99,8	100	<i>Melanotus similis</i>	948,452	91,7	99,4	84,06
<i>Melanotus similis</i>	1155,28	99,9	99,8	100	<i>Melanotus similis</i>	961,378	91,8	99,4	84,24
<i>Melanotus similis</i>	1142,35	99,8	99,5	100	<i>Melanotus similis</i>	965,071	91,9	99,4	84,29
<i>Melanotus similis</i>	1142,35	99,8	99,5	100	<i>Melanotus similis</i>	948,452	91,7	99,4	84,06
<i>Melanotus similis</i>	1153,43	99,8	99,7	100	<i>Melanotus similis</i>	959,531	91,8	99,2	84,29
<i>Melanotus similis</i>	1107,26	99,8	99,7	100	<i>Melanotus similis</i>	918,905	91,5	99,4	83,64
<i>Euschistus tristigmus</i>	1162,66	99,9	99,8	100	<i>Euschistus tristigmus</i>	979,845	92,1	99,8	84,34
<i>Euschistus servus</i>	1149,74	99,8	99,7	100	<i>Euschistus servus</i>	955,838	91,7	99,2	84,24
<i>Banasa dimiata</i>	1147,89	100	100	100	<i>Banasa dimiata</i>	965,071	92	100	84,06
<i>Euschistus servus</i>	1072,18	100	100	100	<i>Euschistus servus</i>	861,659	90,9	99	83,93
<i>Banasa dimiata</i>	1072,18	100	100	100	<i>Banasa dimiata</i>	883,819	91,4	99,8	82,93
<i>Euschistus servus</i>	1166,36	100	100	100	<i>Euschistus servus</i>	950,298	91,6	98,9	84,31
<i>Euschistus servus</i>	1072,18	100	100	100	<i>Euschistus servus</i>	861,659	90,9	99	82,93
<i>Euschistus servus</i>	1068,48	100	100	100	<i>Euschistus servus</i>	857,966	90,9	99	82,87
<i>Euschistus servus</i>	1072,18	100	100	100	<i>Euschistus servus</i>	861,659	90,9	99	82,93
<i>Brochymena quadripustulata</i>	1140,5	99,9	99,8	100	<i>Brochymena quadripustulata</i>	963,225	92	100	84,03
<i>Brochymena arborea</i>	1026,01	97,8	100	95,69	<i>Brochymena arborea</i>	889,359	91,5	100	82,93
<i>Brochymena arborea</i>	1146,04	100	100	100	<i>Brochymena arborea</i>	963,225	92	100	84,03

DIFFUSION DES RÉSULTATS

La majorité de la diffusion des résultats du projet est planifiée pour le mois d'octobre 2017 et il comprendra les éléments suivants :

1. Mise en ligne du rapport sur le site web de l'IRDA dès l'acceptation par le responsable du programme;
2. Publicité Facebook IRDA programmée dès l'acceptation par le responsable du programme (1156 abonnés et 1086 personnes atteintes);
3. Publicité sur Twitter IRDA dès l'acceptation par le responsable du programme (1011 abonnés);
4. Encart dans l'Agrosolution Express qui paraîtra en octobre 2017 (1657 abonnés);
5. Dépôt sur Agri-réseau section phytoprotection (3959 abonnés) dès l'acceptation par le responsable du programme;
6. Production d'une fiche synthèse IRDA (en cours de production) et dépôt sur le site web de l'IRDA;
7. Poster présenté au congrès à la Société d'entomologie du Québec les 23 et 24 novembre 2017;
8. Formation aux utilisateurs potentiels programmée pour l'hiver 2018 avec la collaboration du Laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ.

APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE

Ce projet permettra de rendre disponible la méthodologie détaillée et pertinente pour utiliser l'identification moléculaire par les équipes de recherche qui le désirent selon les besoins reliés à leurs différents projets de recherche. Le potentiel d'applicabilité des résultats du projet est important puisque plusieurs institutions sont maintenant équipées de matériels qui leur permettent d'offrir des services de diagnostic moléculaire. Par la mise au point des protocoles adaptés pour des spécimens de collection, le Laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection du MAPAQ pourra continuer de référencer les spécimens de la CIQ et de diversifier son offre de service dans le cadre du RAP. Le partenariat avec le laboratoire de diagnostic permet une utilisation directe des résultats pour le bénéfice des intervenants de première ligne du monde agricole québécois (agronomes, clubs, producteurs et autres).

POINT DE CONTACT POUR INFORMATION

Nom du responsable du projet : Annabelle Firlej, chercheure entomologiste

Téléphone : 450-653-7368 poste 363

Télécopieur : 450 653-1927

Courriel : annabelle.firlej@irda.qc.ca

REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

Ce projet a été réalisé en vertu du sous-volet 3.2 du programme Prime-Vert 2013-2018 et il a bénéficié d'une aide financière du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ) par l'entremise du Fonds vert.

ANNEXE 1 – Procédure de sélection des spécimens et de prélèvement de patte d'insectes provenant d'une collection en vue du référencement par barcode.

INTRODUCTION

Cette procédure est une marche à suivre qui permet de prioriser les spécimens à sélectionner en vue de les référencer par barcode.

1) Informations nécessaires pour chaque spécimen à référencer

1. Identifiant (code) unique propre au spécimen (lui en donner un s'il n'en possède pas)
2. Nom de l'espèce
3. Pays
4. Latitude / longitude (Nom de la ville où le spécimen fut collecté est aussi valable)
5. Nom de la personne ayant identifié le spécimen
6. Nom du collectionneur
7. Date de collection

Note : Les points 1.1 à 1.3 sont obligatoires pour une publication dans NCBI. Les points 1.4 à 1.7 sont recommandés.

2) Espèces à prioriser

Suite à une recherche sur les bases de données NCBI, plusieurs espèces peuvent être ciblées :

1. Les espèces n'ayant aucune référence « Barcode »
2. Les espèces n'ayant aucune référence « Barcode » en Amérique du Nord
3. Les espèces n'ayant aucune référence « Barcode » au Canada
4. Les espèces n'ayant aucune référence « Barcode » au Québec

3) Spécimens à prioriser

Les critères à favoriser pour prioriser les spécimens sont les suivants :

1. Ceux pouvant être **totalemment détruits (surtout pour les plus petits spécimens)**
2. Ceux ayant été collectés après l'année 2000 (**moins de 15 ans si possible**)
3. Ceux possédant **toutes leurs pattes**
**Toujours laisser une patte par segment thoracique pour la collection*
4. Ceux dont il y a **plus de 3 spécimens** pour l'espèce en question

4) Sélection de la patte

1. Patte postérieure droite (P3D)
2. Patte médiane droite (P2D)
3. Patte antérieure droite (P1D)
4. Patte postérieure gauche (P3G)
5. Patte médiane gauche (P2G)
6. Patte antérieure gauche (P1G)

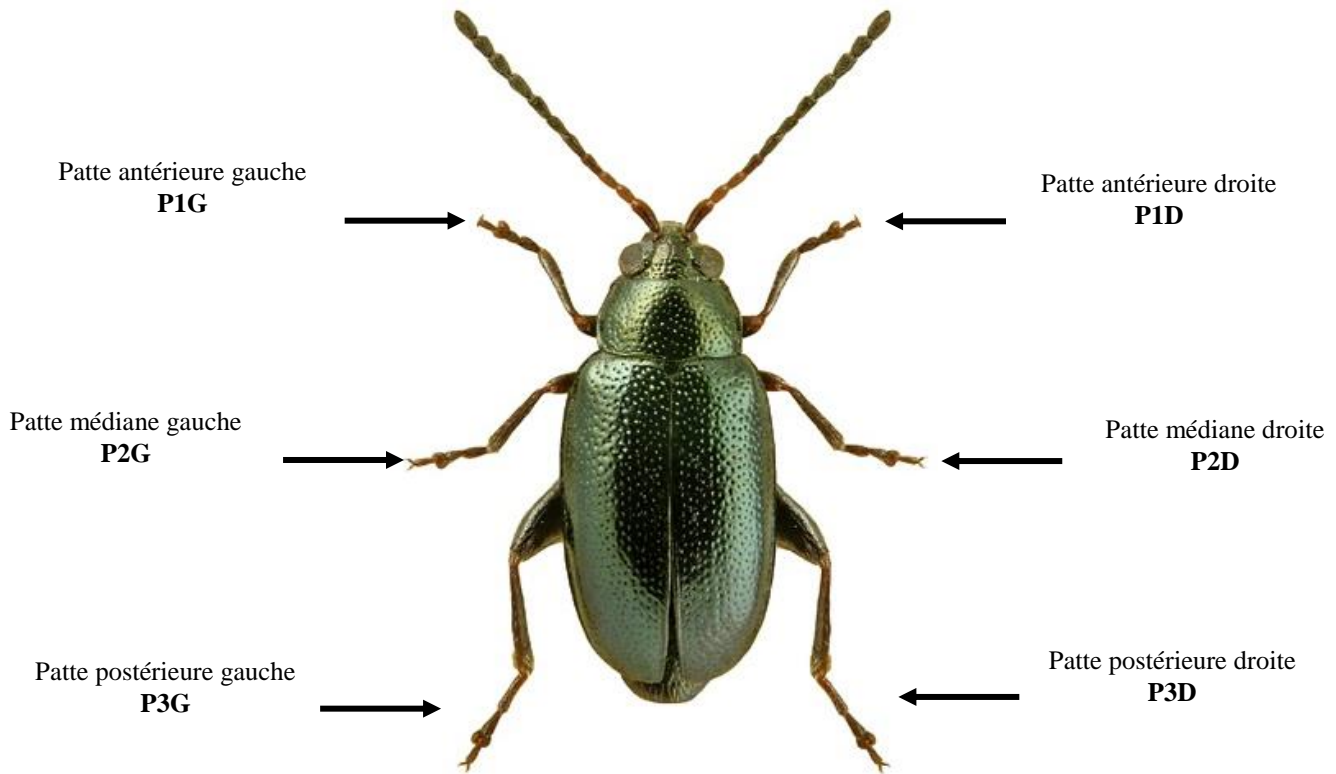


Figure 1 : Identification des pattes selon un spécimen de *Phyllotreta cruciferae*

5. Protocole de prélèvement de patte

Le port du sarrau et de gants de nitrile est obligatoire tout au long des manipulations afin d'éviter la contamination des échantillons.

1. Identifier au préalable le **tube 1,5 mL stérile** dans lequel la patte sera déposée pour l'extraction d'ADN. Les tubes devront comporter **le même numéro que le numéro attribué dans la collection**.
2. Toujours travailler au-dessus d'un pétri de verre préalablement nettoyé à l'EtOH 70% avec un Kimwipe.
3. Tremper les pinces fines non-crantées dans l'EtOH 70% et passer à la flamme. Attendre quelques secondes avant de toucher au spécimen.
4. Prélever une des pattes postérieures du spécimen (voir **figure 1**) avec les pinces (une patte préférablement une patte intacte et complète). S'il est difficile de prélever les pattes avec les pinces, il est possible d'utiliser un scalpel ou des ciseaux de dissection (préalablement passés à la flamme).
5. Déposer la patte dans le tube 1,5 mL pré-identifié. Mettre le tube dans la boîte contenant les pattes.
6. Replacer le spécimen dans la boîte de collection.
7. Essuyer les pinces avec un Kimwipe et les remettre ensuite dans l'EtOH 70%.
8. Nettoyer le pétri de verre à l'EtOH 70% avec un Kimwipe.
9. Répéter les étapes 3 à 8 jusqu'à ce que tous les spécimens soient traités.
10. Si les spécimens étaient préservés dans l'EtOH, ajouter de l'EtOH 100% dans les tubes contenant la patte.

6. Référence

Image Figure 1. *Phyllotreta cruciferae*

<http://baza.biomap.pl/en/taxon/species->

[phyllotreta_cruciferae/photos_tx/tffile/LechBorowiec_Phyllotreta_cruciferae_ov.jpg](http://baza.biomap.pl/en/taxon/species-phyllotreta_cruciferae/photos_tx/tffile/LechBorowiec_Phyllotreta_cruciferae_ov.jpg)

ANNEXE 2 – Protocole d'extraction d'ADN d'insectes de collection par kit d'extraction sur colonne (NucleoSpin® Tissue de MACHEREY-NAGEL)

Toutes les étapes de cette procédure doivent être effectuées selon les bonnes pratiques de laboratoire. Le port du sarrau, des gants de nitrile et des lunettes de sécurité est obligatoire tout au long des manipulations.

INTRODUCTION

Cette procédure permet d'extraire l'ADN de spécimens de collection à l'aide d'un kit d'extraction sur colonne commercial (MACHEREY-NAGEL - NucleoSpin® Tissue).

1) Préparation des échantillons

1. Ouvrir un bain sec à 56 °C.
2. Identifier au préalable les **tubes 1,5 mL stériles** dans lesquels l'extraction d'ADN aura lieu. Pour cette étape, les tubes peuvent simplement porter un numéro et le reste de l'information sur les spécimens peut figurer dans le cahier de laboratoire.
3. Si les pattes ne sont pas déjà isolées, organiser les spécimens de sorte qu'ils soient ordonnés pour faciliter le prélèvement de pattes (Voir Annexe 1).
4. Toujours travailler au-dessus d'un pétri de verre préalablement nettoyé à l'EtOH 70% avec un Kimwipe.
5. Tremper les pinces fines non-crantées dans l'EtOH 70% et passer à la flamme.
6. Prélever la patte postérieure droite du spécimen (lorsque vue de dos) avec les pinces. S'il est difficile de prélever les pattes avec les pinces, il est possible d'utiliser un scalpel ou des ciseaux des dissections (préalablement passés à la flamme).
7. Déposer la patte dans le tube 1,5 mL pré-identifié.
8. Mettre les pinces dans l'EtOH 70% et nettoyer le pétri de verre à l'EtOH 70% avec un Kimwipe.
9. Répéter les étapes 5 à 8 jusqu'à ce que tous les spécimens soient traités.
10. Si les spécimens étaient préservés dans l'EtOH, bien les sécher avant de poursuivre en les incubant **30 minutes à 56 °C** avec le couvercle ouvert, mais couvert du mouchoir Kimwipe.

2) Extraction de l'ADN

1. Utiliser les produits fournis dans le kit.
2. Centrifuger les tubes 10 secondes (concentrer les tissus dans le fond du tube).
3. Ajouter **180 µL de tampon T1** dans chacun des tubes.
4. À l'aide d'un micropipon stérile, broyer l'échantillon.
5. Ajouter **25 µL de protéinase K** et mélanger au vortex 5 sec.
6. Centrifuger les tubes 10 secondes (concentrer les tissus dans le fond du tube).
7. Incuber les tubes dans un bain sec à **56 °C pendant 1h**, en prenant soin de **vortexer** les tubes après **20 min et 40 min** d'incubation.

8. Vortexer les tubes pendant 15 secondes. Ajouter **200 µL de tampon B3** (avec la pipette P1000).
9. Vortexer les tubes pendant 15 secondes. Incuber les tubes dans un bain sec à **70 °C pendant 10 min.**
10. Centrifuger à **1 000 RPM** (100 g) pendant **1 minute** afin de décanter les débris d'insectes. S'il n'y a pas formation de culot; recommencer à 1 500 RPM (112 g) pendant 1 minute.
11. Transférer le surnageant (environ 400 µL) dans un autre microtube de 1,5 mL.
12. Ajouter **210 µL d'EtOH 100% non-dénaturé** et vortexer 5 secondes.
13. Prélever l'ensemble de la solution (environ 600 µL) et la transférer dans une colonne NucleoSpin préalablement déposée et identifiée dans un tube collecteur.
14. Centrifuger à **10 700 RPM** (11 000 g) pendant **1 minute**. Jeter l'éluat un bécher et placer la colonne dans un nouveau tube collecteur. Répéter s'il reste de la solution dans le tube.
15. Ajouter **500 µl de tampon BW** dans la colonne. Centrifuger à **10 700 RPM** (11 000 g) pendant **1 minute**. Jeter l'éluat dans un bécher et placer la colonne dans un nouveau tube collecteur.
16. Ajouter **600 µl de tampon B5** dans la colonne. Centrifuger à **10 700 RPM** (11 000 g) pendant **1 minute**. Jeter l'éluat dans un bécher et replacer la colonne dans le même tube collecteur.
17. Centrifuger une autre fois à **10 700 RPM** (11 000 g) pendant **1 minute** et ensuite placer la colonne dans un micro-tube stérile de 1,5 mL pré-identifié (faire attention à ce que l'extrémité de la colonne ne touche pas à l'éluat).



NOTE : Prendre soin d'identifier le tube de 1,5 mL avec le bon code du spécimen puisque ce tube contiendra l'ADN extrait.

18. Ajouter **50 µL de tampon BE directement** sur le filtre de la colonne. Laisser reposer **3 minutes**. Centrifuger à **10 700 RPM (11 000 g)** pendant **1 minute**.
19. Jeter la colonne, l'ADN se trouve dans le micro-tube 1,5 mL.
20. Mettre les micro-tubes au réfrigérateur entre les manipulations. Conserver au congélateur pour du plus long terme.

3) Dosage de l'ADN par spectrophotométrie

1. Mettre en marche l'appareil TECAN (spectrophotomètre), démarrer le logiciel « i-control 1.9 » et sélectionner l'onglet « Applications » situé en bas à gauche.
2. Pour la calibration des blancs, ajouter **2 µL/puits** de la **solution de dilution** (ex : Tampon AE, eau HPLC, etc.) sur la plaque NanoQuant.



NOTE : Toujours mesurer les échantillons et les blancs en duplicata.

3. Ouvrir la porte du lecteur, placer la plaque NanoQuant sur le réceptacle et sélectionner l'option « Individual Blanking ».
4. À l'aide du bouton de gauche de la souris, sélectionner les puits qui sont à lire et insérer la plaque dans le lecteur.
5. Sélectionner « **Start Blanking** ».

6. Une fois la plaque éjectée, nettoyer délicatement les puits à l'aide d'un Kimwipe, rincer avec de l'eau déminéralisée et essuyer à nouveau.
7. Bien **homogénéiser** les échantillons et ajouter **2 µL/puits d'échantillons** sur la plaque nanoQuant.
8. Placer la plaque NanoQuant sur le réceptacle et à l'aide du bouton de gauche de la souris, sélectionner les puits qui sont à lire et insérer la plaque dans le lecteur.
9. Appuyer sur l'icône « **Start** ».
10. Une fois la plaque éjectée, nettoyer délicatement les puits à l'aide d'un Kimwipe, rincer avec de l'eau déminéralisée et essuyer à nouveau.
11. Les résultats sont présentés sous forme de feuille Excel. Considérer la moyenne des 2 résultats puisque tous les échantillons sont mesurés en duplicata.
12. Sauvegarder les résultats avant de quitter, mais **ne pas sauvegarder le protocole**.
13. Fermer le logiciel puis éteindre l'appareil.

4) *Références*

MACHEREY-NAGEL®. NucleoSpin® Tissue. Genomic DNA from tissue, User manual.

Firlej, A., Légaré, J.-P., Landry, J.-F., Hogue, R., Chouinard, G., and Cormier, D. 2013. DNA barcoding: an innovative tool to identify internal lepidopterans in apples. IOBC-WPRS Bulletin, **91**: 269–271.

ANNEXE 3 – Protocole d’amplification standard pour l’analyse ADN d’insectes de collection

Toutes les étapes de cette procédure doivent être effectuées selon les bonnes pratiques de laboratoire. Le port du sarrau, des gants de nitrile et des lunettes de sécurité est obligatoire tout au long des manipulations.

INTRODUCTION

Cette procédure permet d’amplifier le gène mitochondrial COI-5P (région acceptée pour le Barcoding) des spécimens à l’aide de différentes paires d’amorces (voir liste ci-dessous).

Amorces	Séquence (5' -> 3')	Fragment	Auteur
LepF1	5' ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA TTG G 3'	648 pb	a
LepR1	5' TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAT CA 3'		
LepF1	5' ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA TTG G 3'	350 pb	a, b
LEP-R350	5' CTT ATA TTA TTT ATT CGT GGG AAA GC 3'		
LCO1490	5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3'	710 pb	c
HCO2198	5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3'		
C_LepFolF (<i>LepF1:LCO1490</i>)	5' ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA TTG G 3' 5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3'	~700 pb	a, c, d
C_LepFolR (<i>LepR1:HCO2198</i>)	5' TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAT CA 3' 5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3'		

- a. Hebert, P.D., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., and Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**: 14812–14817.
- b. Firllej, A., Légaré, J.-P., Landry, J.-F., Hogue, R., Chouinard, G., and Cormier, D. 2013. DNA barcoding: an innovative tool to identify internal lepidopterans in apples. *IOBC-WPRS Bulletin*, **91**: 269–271.
- c. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.*, **3**: 294–299.
- d. Ivanova N., Publié sur BOLD. Cocktail is a mixture of primers.

1) Préparation de la solution mère du mélange PCR

1. Calculer les quantités de réactifs à ajouter en multipliant par le nombre total de réactions en prévoyant toutes les réactions en duplicata, selon les tableaux suivants :

Réactifs	[] Finale	Volume (μL) / tube X	Volume (μL) total	<input checked="" type="checkbox"/>
H ₂ O PCR	-	3.75		
Tampon amplification 10X	1X	2.50		
MgCl ₂ [50 mM]	1 mM	0.50		
Tréhalose 10%	5%	12.50		
DNTP's [10mM]	0,04 mM	0.10		
*Amorce Forward [10 μM] LepF1	0,1 μM	0.25		
*Amorce Reverse [10 μM] LepR1	0,1 μM	0.25		
TAQ (Platinum) [5U/ μL]		0.15		
Total		20.00		



INCLURE LES CONTRÔLES SUIVANTS PAR TYPE D'AMORCES : 1 blanc (5 μL d'H₂O PCR).



NOTE : Tout au long des manipulations, conserver les réactifs sur bloc réfrigérant.

- Décongeler les réactifs nécessaires et les échantillons sur un bloc thermique réfrigérant.
- Distribuer les réactifs dans un microtube stérile de 1,5 ml dans l'ordre démontré sur la feuille de travail.
- Bien homogénéiser la solution mère par inversion (pas de vortex) et effectuer un *quick spin*.
- Distribuer **20 μL** de la solution mère dans les puits d'une plaque stérile (96 puits) ou des « strips » (8 puits) compatible avec le thermocycleur utilisé.
- Ajouter **5 μL** de l'extrait d'ADN ou de contrôle dans l'ordre suivant (faire des *up and down* avec la micropipette pour homogénéiser) :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- Sceller la plaque (à l'aide d'une règle) avec le scellant compatible avec le thermocycleur ou refermer les « strips » (8 puits). Il est aussi possible de fermer les puits d'une plaque avec des « strips-caps » compatibles (moins d'évaporation et de risque de contamination croisée).
- Centrifuger** la plaque durant **20 secondes** en prenant soin de bien balancer la centrifugeuse à plaque.

2) Amplification dans le thermocycleur

1. Démarrer le thermocycleur et ouvrir une session.
2. Ouvrir le couvercle à l'aide du bouton situé à l'avant de l'appareil.
3. Placer la plaque dans le thermocycleur, refermer le couvercle et sélectionner le programme **LEPF1** qui contient les cycles suivants :

Étape	Température (°C)	Durée	Répétition
Dénaturation initiale	94	1 minute	1x
Dénaturation	94	40 secondes	5x
Hybridation des amorces	45	40 secondes	
Élongation	72	60 secondes	
Dénaturation	94	40 secondes	35x
Hybridation des amorces	51	40 secondes	
Élongation	72	60 secondes	
Élongation finale	68	5 minutes	1x
Maintient	4	∞	-

4. À la fin du cycle, arrêter le programme, ouvrir le couvercle de l'appareil et transférer immédiatement la plaque entre 2-8 °C jusqu'à l'obtention des résultats finaux.
5. Fermer le thermocycleur.

3) Préparation du gel

1. Préparer un gel d'agarose à **2 %** avec l'agarose **Ultrapure™**.
2. Calculer la quantité d'agarose à préparer selon la grandeur du gel nécessaire : **2 g** dans **100 ml** de **TBE 1X**.
3. À l'aide de la balance de comptoir, peser la quantité d'agarose nécessaire dans une nacelle.
4. Dans une bouteille de verre de 250 ml, ajouter l'agarose au tampon **TBE 1X** en agitant constamment. Ceci permet une bonne dispersion des particules d'agarose.
5. Ajouter le **SYBR™ Safe** dans l'agarose et mélanger. Pour **100 ml** de gel, ajouter **10 µL** de **SYBR™ Safe**.
6. Chauffer au four micro-ondes, avec le bouchon un peu vissé, à **puissance maximale pendant 30 secondes** ou jusqu'à ce que des bulles apparaissent dans la solution.
7. Agiter la solution.



ATTENTION : Toujours utiliser les manchons pour manipuler la bouteille et surveiller

8. Continuer à chauffer au four micro-ondes à **puissance maximale** jusqu'à ce que tous les cristaux soient dissous et que la solution soit homogène.
9. Agiter doucement la solution afin de libérer les bulles présentes.

10. Laisser refroidir l'agarose à t° pièce jusqu'à 50-60°C (15 minutes).
11. Installer le moule dans l'appareil à électrophorèse.
12. Couler l'agarose dans le moule en prenant soin d'éviter la formation de bulles. Si des bulles se forment, les enlever à l'aide d'un embout de micropipette.
13. Mettre les peignes en place immédiatement après avoir coulé l'agarose.
14. Laisser polymériser l'agarose à t° pièce pendant 45 minutes.
15. Retirer le moule contenant le gel et le placer correctement dans l'appareil.
16. Ajouter du TBE IX dans l'appareil à électrophorèse afin de recouvrir le gel. Le niveau de liquide doit être d'environ 4 mm au-dessus du gel.
17. Retirer délicatement les peignes et rincer les puits avec du TBE IX afin d'enlever les débris d'agarose.

4) Chargement des amplicons dans l'appareil à électrophorèse

1. Dans les puits d'une plaque ELISA, ajouter 1 µl de 6X Orange DNA Gel Loading Buffer qui est la solution de tampon de chargement.

INCLURE 1 CONTRÔLE : Un contrôle blanc du gel (3 µl d'H₂O PCR et 1 µl de tampon de chargement).

2. Homogénéiser les amplicons en effectuant des *up and down* avec la micropipette.
3. Ajouter 3 µl d'amplicon dans les puits contenant le tampon de chargement.

ATTENTION : Afin s'assurer que nous avons suffisamment de volume de produit pour le séquençage, 20 µl ont déjà été prélevés, ne laissant normalement que 5 µl. Toutefois, en raison de l'évaporation des amplicons lors de l'amplification, il est possible que le volume résiduel soit < à 3 µl. Dans ce cas, prélever le restant du volume et le mélanger avec 1 µl de 6X Orange DNA Gel Loading.



Remplir les puits du gel selon le schéma suivant :

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51					
Blanc gel	DNA Mass Ladder																																																						DNA Mass Ladder

4. Placer l'extrémité de l'embout au-dessus du puits et l'enfoncer lentement. Remplir le puits avec **4 µl** du mélange *amplicon/tampon de chargement*, en évitant la formation de bulles.
5. Changer de tips entre chaque échantillon ou prendre soin de rincer 5x le tips dans le *TBE IX* dans l'appareil.
6. Remplir un des puits avec **2 µl** de l'échelle *O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder*.
7. Placer le couvercle de l'appareil à électrophorèse, brancher les câbles (le câble noir doit être du côté des puits de chargement) et mettre le bloc d'alimentation en marche.
8. Sélectionner les paramètres du cycle: **120 volts, 400 mAmps, 60 minutes**.
9. Démarrer la migration. La formation de petites bulles dans le *TBE IX* indique la présence de courant.
10. À la fin de la migration, mettre le bloc d'alimentation en arrêt, retirer les câbles et le couvercle de l'appareil à électrophorèse.

5) *Visualisation des fragments d'ADN*

1. Démarrer le logiciel *Image Lab*.
2. À l'aide la spatule, placer le gel sur la plaque du transilluminateur du système de visualisation *GelDoc XR+*.
3. Fermer la porte de la chambre noire.
4. Dans le logiciel *Image Lab*, sélectionner les paramètres voulus et procéder à la visualisation et à la photographie du gel en utilisant le filtre *SYBR Green* qui émet à 535 nm.



ATTENTION : Toujours fermer la porte avant de mettre les *UV* en fonction, sinon, porter des lunettes de sécurité (*UVEX*).

5. Fermer l'appareil et le programme.

6) *Références*

Thermo Scientific™. O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder. Pub. No. MAN0013031 Rev. 7

Invitrogen™. Platinum™ Taq DNA Polymerase. Pub. No. MAN0000925 Rev. B.0

Invitrogen™. UltraPure™ Agarose. Part No. 251044W

Invitrogen™. SYBR™ Safe DNA Gel Stain. Pub. No. MAN0002338 [MP33100] Rev. A.0

Firlej, A., Légaré, J.-P., Landry, J.-F., Hogue, R., Chouinard, G., and Cormier, D. 2013. DNA barcoding: an innovative tool to identify internal lepidopterans in apples. *IOBC-WPRS Bulletin*, 91: 269–271.

ANNEXE 4 – Protocole d’amplification nichée pour l’analyse ADN d’insectes de collection

Toutes les étapes de cette procédure doivent être effectuées selon les bonnes pratiques de laboratoire. Le port du sarrau, des gants de nitrile et des lunettes de sécurité est obligatoire tout au long des manipulations.

INTRODUCTION

Cette procédure permet s’amplifier le gène mitochondrial COI-5P (région acceptée pour le Barcoding) des spécimens à l’aide de différentes paires d’amorces (voir liste ci-dessous).

Cette méthode consiste à faire des amplifications nichées (deux amplifications, l’une à la suite de l’autre) en utilisant des paires d’amorces dégénérées produisant des amplicons de petite taille (~300 pb) qui se chevauchent (overlap).

Amorces	Séquence (5' -> 3')	Fragment	Protocole	Auteur
AMbc0f-1m	M13F-TCW ACW AAY CAY AAR RWT ATY GG	329 pb	AMbc-1st	a
AMbc5r-1m	M13R-GAD ARW GGN GGR TAN ACD GTT C			
AMbc3f-1m	M13F-GCH CCH GAY ATA GCN TTY CCN CG	319 pb	AMbc-1st	
AMbc3r-1m	M13R-ARY ATN GTR ATN GCN CCN GC			
M13F ^{b,c}	GTA AAA CGA CGG CCA GT	313 pb	AMbc-2nd	
AMbc5r-2m	M13R-GTTCANCCNGTWCCWGCNCC			
AMbc3f-2m	M13F-TTYCCNCGRMTRAAYAAAYATNAG	304 pb	AMbc-2nd	
M13R ^{b,c}	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G			

- Mitchell, A. 2015. Collecting in collections: a PCR strategy and primer set for DNA barcoding of decades-old dried museum specimens. *Molecular ecology resources*, **15**: 1102–1111.
- Il existe différentes versions d’amorces M13. La séquence présentée ici est celle utilisée pas Génome Québec. Voir c) pour la séquence originale.
- Messing, J. “New M13 Vectors for Cloning.” *Methods in Enzymology* 101 (1983): 20–78.

1) Préparation de la 1^{ère} solution mère du mélange PCR

- Calculer les quantités de réactifs à ajouter en multipliant par le nombre total de réactions en prévoyant toutes les réactions en duplicata, selon les tableaux suivants :

Réactifs	[] Finale	Volume (µL) / tube X	Volume (µL) total	☑
H ₂ O PCR	-	3.75		
Tampon amplification 10X	1X	2.50		
MgCl ₂ [50 mM]	1 mM	0.50		
Tréhalose 10%	5%	12.50		
DNTP's [10mM]	0,04 mM	0.10		
*Amorce Forward [10µM]	0,1 µM	0.25		
*Amorce Reverse [10µM]	0,1 µM	0.25		

TAQ (Platinum) [5U/ μ L]		0.15		
Total		20.00		



INCLURE LES CONTRÔLES SUIVANTS PAR TYPE D'AMORCES : 1 blanc (5 μ L d'H₂O PCR).



NOTE : Tout au long des manipulations, conserver les réactifs sur bloc réfrigérant.

- Décongeler les réactifs nécessaires et les échantillons sur un bloc thermique réfrigérant.
- Distribuer les réactifs dans un microtube stérile de 1,5 ml dans l'ordre démontré sur la feuille de travail.
- Bien homogénéiser la solution mère par inversion (pas de vortex) et effectuer un *quick spin*.
- Distribuer **20 μ L** de la solution mère dans les puits d'une plaque stérile (96 puits) ou des « strips » (8 puits) compatible avec le thermocycleur utilisé.
- Ajouter **5 μ L** de l'extrait d'ADN ou de contrôle dans l'ordre suivant (faire des *up and down* avec la micropipette pour homogénéiser) :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- Sceller la plaque (à l'aide d'une règle) avec le scellant compatible avec le thermocycleur ou refermer les « strips » (8 puits). Il est aussi possible de fermer les puits d'une plaque avec des « strips-caps » compatibles (moins d'évaporation et de risque de contamination croisée).
- Centrifuger** la plaque durant **20** secondes en prenant soin de bien balancer la centrifugeuse à plaque.

2) 1^{ère} amplification dans le thermocycleur

- Démarrer le thermocycleur et ouvrir une session.
- Ouvrir le couvercle à l'aide du bouton situé à l'avant de l'appareil.
- Placer la plaque dans le thermocycleur, refermer le couvercle et sélectionner le programme **AMbc-1st** qui contient les cycles suivants :

Étape	Température (°C)	Durée	Répétition
Dénaturation initiale	94	2 minutes	1x
Dénaturation	94	30 secondes	

E												
F												
G												
H												



NOTE : Pour faciliter les manipulations, il est plus simple de travailler avec 2 plaques PCR : 1^{ère} plaque avec **15 µL d'H₂O PCR** et 2^e plaque avec **23,50 µL de MasterMix**.
Ensuite, toujours avec le même tip, mettre 1,5 µL d'amplicon primaire dans 15 µL d'H₂O PCR, pour ensuite mettre 1,5 µL d'amplicon dilué 1:10 dans 23,50 µL de MasterMix.

7. Sceller la plaque (à l'aide d'une règle) avec le scellant compatible avec le thermocycleur ou refermer les « strips » (8 puits). Il est aussi possible de fermer les puits d'une plaque avec des « strips-caps » compatibles (moins d'évaporation et de risque de contamination croisée).
8. **Centrifuger** la plaque durant **20 secondes** en prenant soin de bien balancer la centrifugeuse à plaque.

4) 2^e amplification dans le thermocycleur

1. Démarrer le thermocycleur et ouvrir une session.
2. Ouvrir le couvercle à l'aide du bouton situé à l'avant de l'appareil.
3. Placer la plaque dans le thermocycleur, refermer le couvercle et sélectionner le programme **AMbc-2nd** qui contient les cycles suivants :

Étape	Température (°C)	Durée	Répétition
Dénaturation initiale	94	2 minutes	1x
Dénaturation	94	30 secondes	35 x
Hybridation des amorces	50	40 secondes	
Élongation	72	60 secondes	
Élongation finale	72	7 minutes	1x
Maintient	4	∞	-

4. À la fin du cycle, arrêter le programme, ouvrir le couvercle de l'appareil et transférer immédiatement la plaque entre 2-8 °C jusqu'à l'obtention des résultats finaux.
5. Fermer le thermocycleur.

5) Préparation du gel

1. Préparer un gel d'agarose à **2 %** avec l'agarose **Ultrapure™**.
2. Calculer la quantité d'agarose à préparer selon la grandeur du gel nécessaire : **2 g** dans **100 ml** de **TBE 1X**.
3. À l'aide de la balance de comptoir, peser la quantité d'agarose nécessaire dans une nacelle.

4. Dans une bouteille de verre de 250 ml, ajouter l'agarose au tampon *TBE IX* en agitant constamment. Ceci permet une bonne dispersion des particules d'agarose.
5. Ajouter le **SYBR™ Safe** dans l'agarose et mélanger. Pour **100 ml** de gel, ajouter **10 µL** de **SYBR™ Safe**.
6. Chauffer au four micro-ondes, avec le bouchon un peu vissé, à **puissance maximale pendant 30 secondes** ou jusqu'à ce que des bulles apparaissent dans la solution.
7. Agiter la solution.



ATTENTION : Toujours utiliser les manchons pour manipuler la bouteille et surveiller

8. Continuer à chauffer au four micro-ondes à **puissance maximale** jusqu'à ce que tous les cristaux soient dissous et que la solution soit homogène.
9. Agiter doucement la solution afin de libérer les bulles présentes.
10. Laisser refroidir l'agarose à t° pièce jusqu'à **50-60°C** (15 minutes).
11. Installer le moule dans l'appareil à électrophorèse.
12. Couler l'agarose dans le moule en prenant soin d'éviter la formation de bulles. Si des bulles se forment, les enlever à l'aide d'un embout de micropipette.
13. Mettre les peignes en place immédiatement après avoir coulé l'agarose.
14. Laisser polymériser l'agarose à t° pièce pendant **45 minutes**.
15. Retirer le moule contenant le gel et le placer correctement l'appareil.
16. Ajouter du *TBE IX* dans l'appareil à électrophorèse afin de recouvrir le gel. Le niveau de liquide doit être d'environ **4 mm** au-dessus du gel.
17. Retirer délicatement les peignes et rincer les puits avec du *TBE IX* afin d'enlever les débris d'agarose.

6) Chargement des amplicons dans l'appareil à électrophorèse

1. Dans les puits d'une plaque ELISA, ajouter **1 µl de 6X Orange DNA Gel Loading Buffer** qui est la solution de tampon de chargement.

INCLURE 1 CONTRÔLE : Un contrôle blanc du gel (3 µl d'H ₂ O PCR et 1 µl de tampon de chargement).
--

2. Homogénéiser les amplicons en effectuant des *up and down* avec la micropipette.
3. Ajouter **3 µl d'amplicon** dans les puits contenant le tampon de chargement.



ATTENTION : Afin s'assurer que nous avons suffisamment de volume de produit pour le séquençage, **20 µl** ont déjà été prélevés, ne laissant normalement que **5 µl**. Toutefois, en raison de l'évaporation des amplicons lors de l'amplification, il est possible que le volume résiduel soit **< que 3 µl**. Dans ce cas, prélever le restant du volume et le mélanger avec **1 µl de 6X Orange DNA Gel Loading**.

Remplir les puits du gel selon le schéma suivant :

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51			
Blanc gel	DNA Mass Ladder																																																				DNA Mass Ladder

4. Placer l'extrémité de l'embout au-dessus du puits et l'enfoncer lentement. Remplir le puits avec **4 µl** du mélange *amplicon/tampon de chargement*, en évitant la formation de bulles.
5. Changer de tips entre chaque échantillon ou prendre soin de rincer 5x le tip dans le *TBE 1X* dans l'appareil.
6. Remplir un des puits avec **2 µl** de l'échelle *O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder*.
7. Placer le couvercle de l'appareil à électrophorèse, brancher les câbles (le câble noir doit être du côté des puits de chargement) et mettre le bloc d'alimentation en marche.
8. Sélectionner les paramètres du cycle: **120 volts, 400 mAmps, 60 minutes**.
9. Démarrer la migration. La formation de petites bulles dans le *TBE 1X* indique la présence de courant.
10. À la fin de la migration, mettre le bloc d'alimentation en arrêt, retirer les câbles et le couvercle de l'appareil à électrophorèse.

7) Visualisation des fragments d'ADN

1. Démarrer le logiciel *Image Lab*.
2. À l'aide la spatule, placer le gel sur la plaque du transilluminateur du système de visualisation *GelDoc XR+*.
3. Fermer la porte de la chambre noire.
4. Dans le logiciel *Image Lab*, sélectionner les paramètres voulus et procéder à la visualisation et à la photographie du gel en utilisant le filtre *SYBR Green* qui émet à 535 nm.



ATTENTION : Toujours fermer la porte avant de mettre les *UV* en fonction, sinon, porter des lunettes de sécurité (*UVEX*).

5. Fermer l'appareil et le programme.

8) *Références*

Thermo Scientific™. O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder. Pub. No. MAN0013031 Rev. 7

Invitrogen™. Platinum™ Taq DNA Polymerase. Pub. No. MAN0000925 Rev. B.0

Invitrogen™. UltraPure™ Agarose. Part No. 251044W

Invitrogen™. SYBR™ Safe DNA Gel Stain. Pub. No. MAN0002338 [MP33100] Rev. A.0

Firlej, A., Légaré, J.-P., Landry, J.-F., Hogue, R., Chouinard, G., and Cormier, D. 2013. DNA barcoding: an innovative tool to identify internal lepidopterans in apples. *IOBC-WPRS Bulletin*, 91: 269–271.

ANNEXE 5 – Protocole d’envoi au séquençage

Toutes les étapes de cette procédure doivent être effectuées selon les bonnes pratiques de laboratoire. Le port du sarrau, des gants de nitrile et des lunettes de sécurité est obligatoire tout au long des manipulations.

INTRODUCTION


Cette procédure permet d’envoyer des amplicons au service de séquençage du Centre d’Innovation Génome Québec et Université McGill afin d’obtenir la séquence d’ADN amplifiés par les différentes paires d’amorces utilisées. Il est important de bien respecter le protocole afin de répondre aux exigences du Centre d’Innovation Génome Québec et Université McGill.


1) Préparation des plaques pour l’envoi

1. Utiliser seulement des « strips » ou des plaques 96 puits (sans jupe ou demi-jupe) pour l’envoi au séquençage. Ne jamais envoyer des tubes à PCR individuelle ou des plaques avec jupe complète.


 **NOTE : Pour 32 réactions et plus, il est plus rentable de prendre une plaque de 96 puits plutôt que de prendre 4 « strips » de 8 tubes.**

2. Regrouper les échantillons les uns à la suite des autres. Pour les « strips », identifiez les tubes par le nom des puits correspondants sur le formulaire de soumission d’échantillons (Voir exemple ci-bas).

 **NOTE : Toute soumission de 48 échantillons et plus doit être faite en plaque de 96 puits.**

 **NOTE : Toujours remplir les puits A01->A12, ensuite B1->B12 et ainsi de suite...**

3. Transférer **10 µl de l’amplicon** dans un puits. Si nous voulons analyser les deux séquences (deux directions), il faut au minimum 20 µl d’amplicon au total (10 µl pour la réaction *Forward* et 10 µl pour la réaction *Reverse*).
4. Procéder de la même façon avec les amorces. Elles doivent être aliquotées dans autant de tubes (si « strips ») que d’échantillons à séquencer, et ce dans le même ordre.
5. Transférer **10 µl d’amorces à 5 µM** dans un puit.

 **NOTE : Ajuster la concentration des amorces si la concentration de travail n’est pas à 5 µM.**

2) Demande de séquençage au centre d’Innovation Génome Québec et Université McGill

1. Aller sur le site suivant : <https://genomequebec.mcgill.ca/nanuqAdministration>
2. Inscrire les informations suivantes :

Nom d’utilisateur :

Mot de passe :

3. Cliquer sur l'onglet « **Plates-formes** » et sur « **Séquençage** ».
4. Cliquer sur « **Soumettre des échantillons** ».
5. Pas nécessaire de remplir l'étape 1.
6. À l'étape 2, remplir le formulaire Excel avec les informations sur nos échantillons. S'inspirer des formulaires précédents.
7. Afin de faciliter le repérage des formulaires, toujours utiliser le format suivant : Seq_AAAA-MM-JJ_01.
8. Importer le fichier Excel à l'étape 2 et sélectionner l'option « **Régulier** ».
9. Cliquer sur l'onglet « **Soumettre** ».
10. S'il y a un message d'erreur, apporter les corrections nécessaires ou contacter le service de séquençage pour de plus amples informations.

Service de séquençage de type Sanger

Téléphone : 514-398-3311 Ext.: 00522

Courriel : sequencing.service@mail.mcgill.ca

11. Une fois la validation complétée avec succès, s'assurer que toutes les informations soient exactes (E.g. le nombre total de séquences demandées, bon de commande, etc.).
12. Cliquer sur l'onglet « **Confirmer soumission d'échantillons** » et une page de confirmation apparaîtra.
13. Conserver le numéro de confirmation attribué par Nanuq, car il permet de faire le suivi de la soumission.
14. Imprimer le bordereau d'expédition.

3) Envoi des échantillons (en main propre)

1. Placer la plaque ou les « strips » dans une plaque réfrigérée de 96 puits. Transporter le tout dans une petite glacière.
2. Joindre une copie de la **photo du gel de l'amplification PCR** avec le **bordereau d'expédition**.
3. Déposer les échantillons **avant 17h00**, accompagnés du bordereau d'expédition, à l'adresse suivante :

Service de séquençage

Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill

740, Avenue Dr-Penfield, pièce 7300

Montréal, QC, H3A 0G1

4) Réception et interprétations des séquences

1. Les résultats de séquençage sont directement accessibles par l'application Web [Nanuq](#). Un message automatisé est envoyé à la personne ayant effectué la soumission dès que les séquences sont disponibles.
2. Cliquer sur l'onglet « **Plates-formes** » et sur « **Séquençage** ».
3. Cliquer sur « **Recherche / Téléchargement données** » dans la section « **Raccourcis** ».
4. Dans « **Type de recherche** », sélectionner « **Chromatogramme(s)** ».
5. Dans « **Critères de recherche** », inscrire le Numéro de lot de soumission ou le nom de plaque de séquençage.
6. Dans « **Format de sortie des résultats** », sélectionner « **Fichiers téléchargeables** ».
7. Dans « **Options de téléchargement des chromatogrammes** », sélectionner « **Format SCF (ver. :3.0)** » pour avoir les fichiers de qualités.
8. Cliquer sur « **Soumettre** » et sauvegarder le dossier.
9. Décompresser les données téléchargées et renommer le dossier contenant les chromatogrammes avec la date d'envoi au séquençage et le numéro de lot de soumission. (Ex : 2016-05-06 - No 190083).

5) *Références*

SERVICES DE SEQUENÇAGE, Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill.
[Séquençage de type Sanger – Guide d'utilisateur.](http://www.gqinnovationcenter.com/documents/sequencing/UserGuide_SangerSequencing_fr.pdf)
http://www.gqinnovationcenter.com/documents/sequencing/UserGuide_SangerSequencing_fr.pdf

SERVICES DE SEQUENÇAGE, Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill.
[Comment soumettre des échantillons.](http://www.gqinnovationcenter.com/documents/sequencing/howToSubmitSamplesTutorial_fr.pdf)
http://www.gqinnovationcenter.com/documents/sequencing/howToSubmitSamplesTutorial_fr.pdf

SERVICES DE SEQUENÇAGE, Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill.
[Interprétation des résultats et troubleshooting.](http://www.gqinnovationcenter.com/documents/sequencing/ResultsInterpretationTroubleshooting_fr.pdf)
http://www.gqinnovationcenter.com/documents/sequencing/ResultsInterpretationTroubleshooting_fr.pdf

ANNEXE 6 – Protocole d'analyse dans Geneious® (adapté pour la stratégie avec amplifications nichées)

Cette procédure permet d'importer les séquences brutes dans Geneious®, de les nettoyer, de les assembler entre elles pour obtenir des séquences consensus et finalement d'interroger (BLAST) les bases de données publiques (E.g. NCBI, BOLD). Noter que ce protocole est adapté pour la stratégie d'amplifications nichées).

1) *Importation des séquences dans Geneious®*

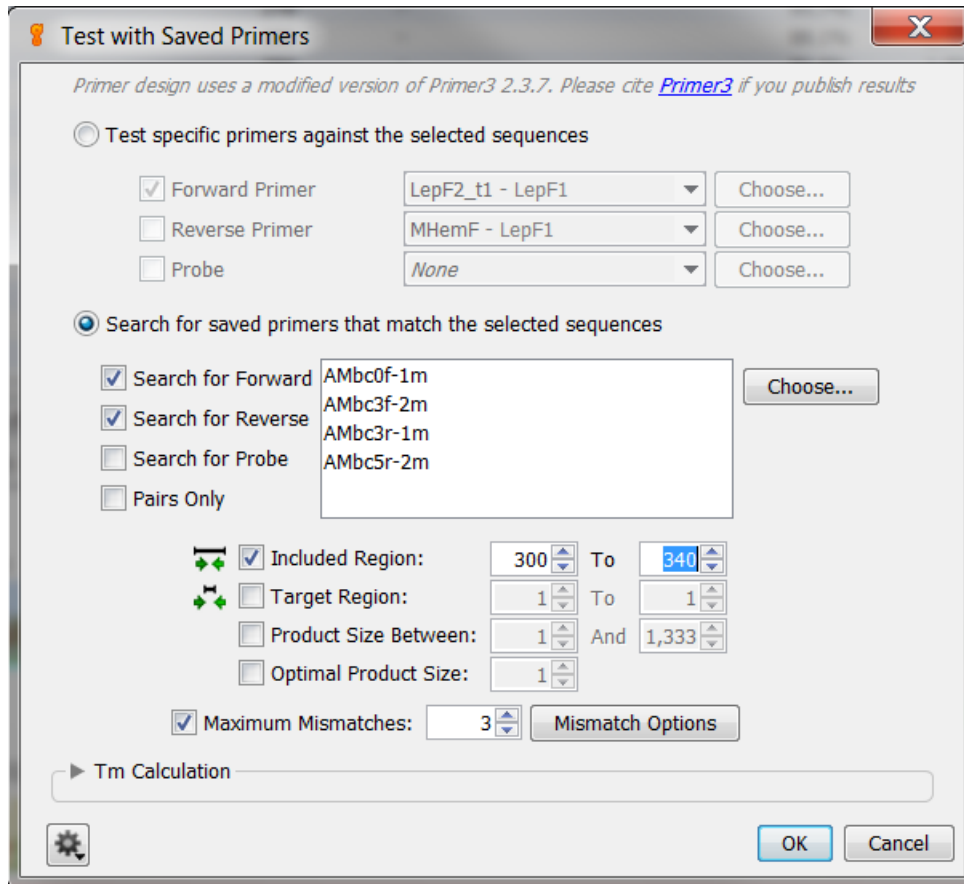
1. Ouvrir **Geneious®**.
2. Sélectionner le dossier où les séquences doivent être importées (Nom de projet, objectif, etc.).
3. Cliquer sur l'onglet « **File** », sur « **Import** » et sur « **From Directory...** » ou utiliser le raccourci (**Ctrl+Alt+I**).
4. S'assurer que le nom du dossier est le même que celui où se trouvent les séquences brutes (facilite le suivi).

2) *Sauvegarde d'amorces dans Geneious®*

1. Si les amorces sont déjà enregistrées dans Geneious®, aller au point 3) *Trouver et retirer les amorces des séquences*.
2. Dans le dossier *local*, créer un nouveau dossier pour enregistrer les amorces.
3. Dans ce nouveau dossier, Cliquer sur l'onglet « **File** », sur « **New** » et sur « **Sequences...** » ou utiliser le raccourci (**Ctrl+N**).
4. Dans la grande boîte de dialogue, copier la séquence de l'amorce dans la direction 5' -> 3'.
5. Dans la case « **Name** », inscrire le nom de l'amorce.
6. Dans la case « **Description** », inscrire le sens de l'amorce (Forward ou Reverse).
7. Dans la case « **Organism** », inscrire l'organisme pour lequel l'amorce est spécifique. Ne rien inscrire si l'amorce n'est pas spécifique.
8. Dans la case « **Type** », sélectionner « **Primer** ».
9. Si l'ensemble de la séquence de l'amorce va s'attacher à l'ADN, ne rien changer et aller au point 11. Toutefois, si ce n'est pas le cas (e.g. les amorces avec queues M13), aller au point 10.
10. Sélectionner uniquement la région d'attache (binding region) de la séquence en question et cliquer sur l'onglet « **←** ». Le nombre de « bp » va s'ajuster au nombre de nucléotides sélectionnés.
11. Cliquez sur « **OK** ». L'amorce est maintenant enregistrée dans Geneious.

3) *Trouver et retirer les amorces des séquences*

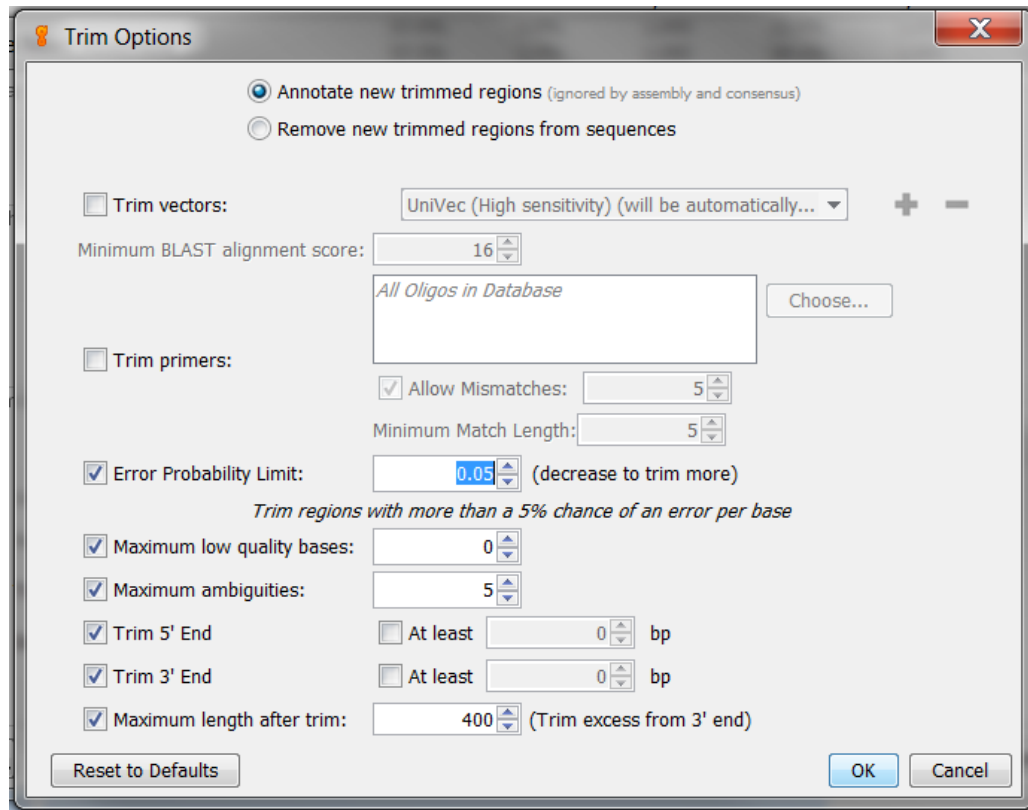
1. Sélectionner chaque séquence (**Ctrl+A**), cliquer sur l'onglet « **Primers** » et sélectionner l'option « **Test with Saved Primers...** ».
2. Sélectionner les options suivantes (en sélectionnant les amorces appropriées) :



3. Il est possible de sélectionner l'option « **Included Region** » pour cibler plus précisément une région de la séquence. Cela permet d'accélérer le processus et de limiter l'annotation d'amorces non désirées. Pour les amorces AMbc, la région d'intérêt se situe généralement entre 300 et 340 pb, peu importe les amorces recherchées.
4. Vérifier que chacune des séquences comporte l'amorce opposée à la fin de la séquence (Ex : Pour une séquence *MI3F*, nous devrions trouver l'amorce *AMbc5r-2m* en fin de séquence).
5. Si l'amorce n'est pas présente, inspecter manuellement. Fort probable que l'amorce est présente, mais avec des erreurs au niveau de la séquence de nucléotides (**Mismatch**). Il est alors possible de refaire le même exercice en sélectionnant une région spécifique, mais en sélectionnant les options « **Include Region** » et « **Maximum Mismatches** ». Commencer avec un « **Maximum Mismatches** » de 5 et augmenter au besoin.
6. Une fois les amorces trouvées, s'assurer de **retirer les séquences codantes pour les amorces du contig final** (regroupement de séquences). Ce permet d'avoir uniquement la région barcode et non par les régions extérieures où se fixent les amorces (une région barcode doit être dépourvue de séquences d'amorces à ces extrémités).

4) Nettoyage des séquences (*Trim Ends*)

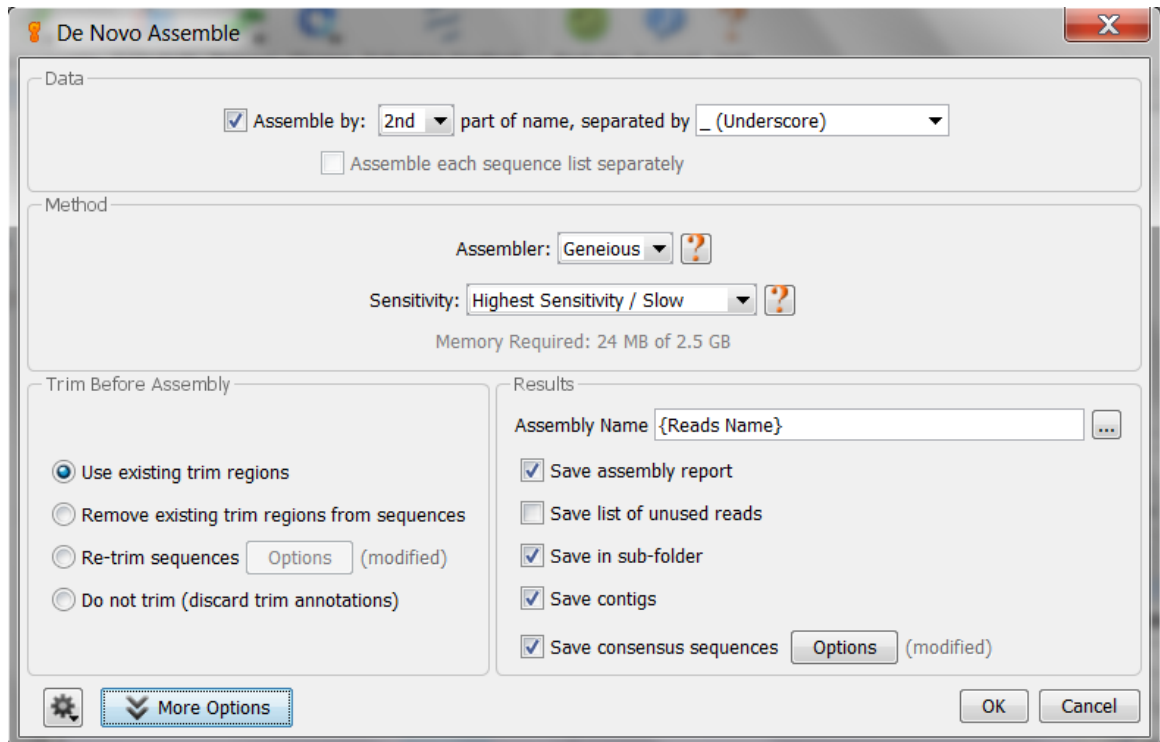
1. Sélectionner chaque séquence (**Ctrl+A**), cliquer sur l'onglet « **Trim Ends** ».
2. Sélectionner les options suivantes :



3. Cliquer sur **OK**. Les séquences seront nettoyées.
4. Inspecter manuellement chaque séquence et ajuster les sections coupées au besoin. Par exemple, s'assurer que les sections codantes pour les amorces soient retirées.
5. Si possible, garder le maximum de nucléotides, et ce même si la séquence est de mauvaise qualité, car cela facilite l'assemblage des séquences. Une fois les séquences assemblées, il sera possible d'exclure celles contenant trop d'ambiguïtés ou étant de trop mauvaises qualités.

5) *Assemblage des séquences*

1. Sélectionner chaque séquence (**Ctrl+A**), cliquer sur l'onglet « **Align/Assemble** » et sélectionner l'option « **De Novo Assemble...** ».
2. Sélectionner les options suivantes :



3. Cliquer sur **OK**. Les séquences seront assemblées.
4. Pour chaque contig (regroupement de séquences), vérifier qu'ils ont tous été formés avec le même code de spécimen. Normalement, les séquences complètes devraient avoir **559 pb**.
5. Si le nombre de paires de base **diffère de 559**, vérifier que les régions retirées au niveau des amorces soient justes. Il est possible que l'on doive retirer un nucléotide d'une séquence. Généralement dans cette situation, la **séquence consensus** comporte un « - » dans la séquence.
6. Mettre en ordre les séquences selon les amorces utilisées pour le séquençage (e.g. M13F, 5r-2m, 3f-2m et M13R). Si les séquences ne sont pas dans le bon sens (e.g. si une séquence provenant d'une amorce **Forward** est considérée **Reverse**), changer le sens de ces séquences en cliquant sur « **R.C.** » (pour *reverse complement*).
7. Au final, on obtient la séquence consensus (assemblage de toutes les séquences d'un même spécimen) de **559 pb** avec **chacune des séquences étant dans le bon sens**, c'est-à-dire dans le sens de l'amorce utilisée pour son séquençage. Normalement, le début d'une séquence barcode devrait commencer par : AACT...
8. Si des modifications ont été apportées aux séquences contigs, effacer le fichier **Consensus sequences** et régénérer un consensus de séquences en sélectionnant tous les contigs et en sélectionnant l'option « Generate consensus sequence ... ».
9. Changer le nom dossier pour « **De Novo Assemble** ».

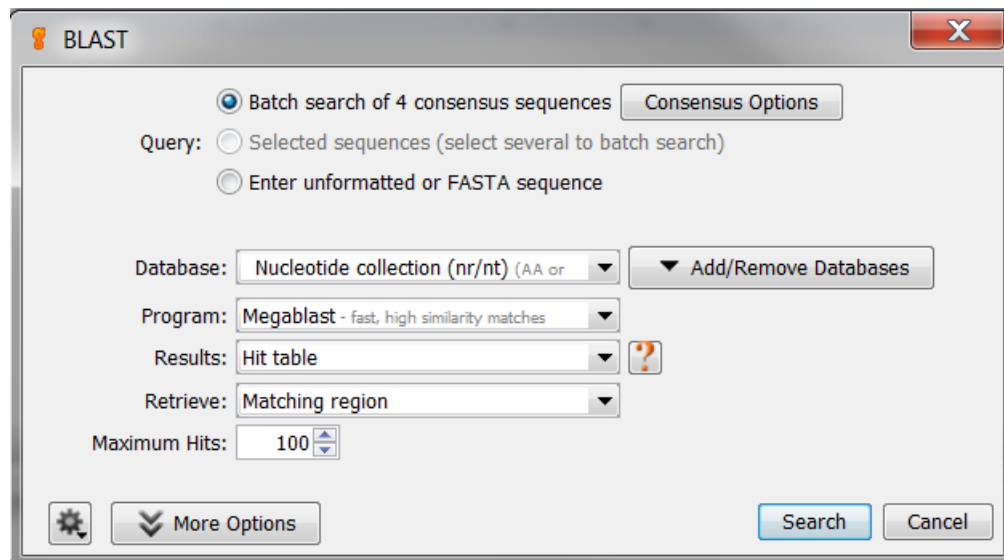
6) *Obtenir la chaîne d'acides aminés (translate) de la séquence consensus*

1. Cliquer sur le fichier **Consensus sequences**, sélectionner l'onglet « Sequence View » dans le bas de la page et sélectionner l'onglet « **Display** » dans le bas droit de la page.

2. Sous « **Display** », sélectionner « **Translation** » pour afficher la traduction des séquences de nucléotides en acide aminé.
3. Dans « **Genetic Code** », sélectionner l'option « **Invertebrate Mitochondrial** ».
4. Finalement, aller dans « **Frame** » et sélectionner le frame (décalage) qui permet d'obtenir une suite d'acides aminés sans erreurs. Normalement, le **frame 2** permet le bon décalage et le début d'une séquence d'acides aminés devrait commencer par : TLYF...
5. Une fois le décalage connu, cliquer sur l'onglet « **Translate** », sélectionner l'option « **Translate entire sequences** » et sélectionner le bon décalage dans la section « **Translation frame** ».
6. Cliquer sur « **OK** ».

7) Recherche ou comparaison des séquences dans NCBI

1. Dans le dossier contenant les contigs, sélectionner le fichier nommé « **Consensus sequences** », cliquer sur l'onglet **BLAST** et sélectionner les options suivantes.



2. Vérifier que les séquences associées sont conformes aux spécimens traités. Par exemple, les séquences devraient au moins être associées à des séquences provenant d'espèces du même genre ou du moins de la même famille.
3. Pour rechercher ou comparer des séquences avec la base de données provenant du BOLD (ou pour toute autre base de données qui n'est pas NCBI) à partir de Geneious®, il faut importer les données sur le disque local.
4. Une fois les données enregistrées, il suffit d'ajouter ces données dans Geneious® en cliquant sur « **Add/Remove Databases** » et de les sélectionner ensuite dans « **Database** ».
5. Finalement, cliquer sur « **Search** ».

ANNEXE 7 - Liste étendue du nombre de spécimens par famille dont les pattes ont été prélevées (Section 1/2).

Espèces classées par ordre	Nombre de spécimens	Séquences NCBI		Espèces classées par ordre	Nombre de spécimens	Séquences NCBI		Espèces classées par ordre	Nombre de spécimens	Séquences NCBI	
		Non	Oui			Non	Oui			Non	Oui
COLEOPTERA	420	133	287								
Buprestidae	24	6	18	<i>Hylesinus aculeatus</i>	3	0	3	Dryophthoridae	8	1	7
<i>Agrilus bilineatus</i>	3	1	2	<i>Hylurgopinus rufipes</i>	3	3	0	<i>Sitophilus granarius</i>	3	1	2
<i>Agrilus horni</i>	3	1	2	<i>Listronotus appendiculatus</i>	2	1	1	<i>Sitophilus oryzae</i>	3	0	3
<i>Agrilus otiosus</i>	3	0	3	<i>Listronotus delumbis</i>	2	0	2	<i>Sitophilus zeamais</i>	2	0	2
<i>Agrilus pensus</i>	1	0	1	<i>Listronotus humilis</i>	2	0	2	Elateridae	134	37	97
<i>Agrilus planipennis</i>	3	1	2	<i>Listronotus oregonensis</i>	2	0	2	<i>Agriotes collaris</i>	2	0	2
<i>Agrilus politus</i>	2	0	2	<i>Listronotus sparsus</i>	1	1	0	<i>Agriotes mancus</i>	2	1	1
<i>Agrilus ruficollis</i>	3	2	1	<i>Listronotus tuberosus</i>	1	0	1	<i>Agriotes oblongicollis</i>	2	1	1
<i>Agrilus vittaticollis</i>	2	0	2	<i>Otiorhynchus ovatus</i>	2	0	2	<i>Agriotes pubescens</i>	2	2	0
<i>Agrilus carpini</i>	1	0	1	<i>Otiorhynchus raucus</i>	5	1	4	<i>Agriotes quebecensis</i>	2	0	2
<i>Agrilus granulatus liragus</i>	3	1	2	<i>Otiorhynchus singularis</i>	2	0	2	<i>Agriotes sputator</i>	1	0	1
Chrysomelidae	27	11	16	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	2	0	2	<i>Agriotes stabilis</i>	3	0	3
<i>Altica ambiens</i>	2	1	1	<i>Pissodes affinis</i>	2	2	0	<i>Ampedus apicatus</i>	4	0	4
<i>Altica chalybaea</i>	2	1	1	<i>Pissodes fiskei</i>	1	0	1	<i>Ampedus deletus</i>	3	0	3
<i>Altica corni</i>	2	0	2	<i>Pissodes nemorensis</i>	2	0	2	<i>Ampedus evansi</i>	5	1	4
<i>Altica prasina</i>	2	1	1	<i>Pissodes rotundatus</i>	2	1	1	<i>Ampedus fuscus</i>	3	0	3
<i>Altica sp.</i>	2	0	2	<i>Pissodes sp.</i>	3	2	1	<i>Ampedus laurentinus</i>	2	0	2
<i>Altica subplicata</i>	2	1	1	<i>Pissodes striatulus</i>	3	0	3	<i>Ampedus luctuosus</i>	3	0	3
<i>Altica sylvia</i>	3	0	3	<i>Pissodes strobili</i>	2	1	1	<i>Ampedus melsheimeri</i>	5	0	5
<i>Altica ulmi</i>	2	2	0	<i>Pityophthorus balsameus</i>	2	2	0	<i>Ampedus mixtus</i>	5	1	4
<i>Altica woodsi</i>	2	2	0	<i>Pityophthorus biovalis</i>	2	1	1	<i>Ampedus nigricans</i>	5	1	4
<i>Chaetocnema minuta</i>	1	0	1	<i>Pityophthorus briscoei</i>	2	2	0	<i>Ampedus nigricollis</i>	3	1	2
<i>Phyllotreta armoraciae</i>	2	1	1	<i>Pityophthorus carinatus</i>	2	2	0	<i>Ampedus pedalis</i>	2	2	0
<i>Phyllotreta cruciferae</i>	3	1	2	<i>Pityophthorus cariniceps</i>	2	2	0	<i>Ampedus protervus</i>	5	3	2
<i>Phyllotreta striolata</i>	2	1	1	<i>Pityophthorus concavus</i>	1	0	1	<i>Ampedus pullus</i>	3	1	2
Curculionidae	155	64	91	<i>Pityophthorus consimilis</i>	1	0	1	<i>Ampedus quebecensis</i>	5	0	5
<i>Anisandrus sayi</i>	3	1	2	<i>Pityophthorus intextus</i>	2	2	0	<i>Ampedus rubricus</i>	2	2	0
<i>Anthonomus eugenii</i>	1	0	1	<i>Pityophthorus nitidus</i>	2	2	0	<i>Ampedus sanguinipennis</i>	2	1	1
<i>Anthonomus nebulosus</i>	2	2	0	<i>Pityophthorus puberulus</i>	2	2	0	<i>Ampedus sp.</i>	2	0	2
<i>Anthonomus quadrigibbus</i>	2	0	2	<i>Pityophthorus pulchellus</i>	2	0	2	<i>Ampedus vitiosus</i>	2	0	2
<i>Anthonomus suturalis</i>	2	2	0	<i>Pityophthorus pulicarius</i>	2	2	0	<i>Corymbitodes elongaticollis</i>	3	0	3
<i>Brachypera zoilus</i>	3	1	2	<i>Pityophthorus sp.</i>	2	2	0	<i>Corymbitodes tarsalis</i>	3	2	1
<i>Ceutorhynchus americanus</i>	2	1	1	<i>Polygraphus rufipennis</i>	3	2	1	<i>Ctenicera kendalli</i>	2	1	1
<i>Ceutorhynchus erysimi</i>	3	1	2	<i>Pseudanthonomus seriesetosus</i>	2	1	1	<i>Dalopius cognatus</i>	2	0	2
<i>Ceutorhynchus neglectus</i>	2	2	0	<i>Scolytus mali</i>	2	1	1	<i>Dalopius gentilis</i>	2	2	0
<i>Ceutorhynchus obstructus</i>	2	1	1	<i>Scolytus multistriatus</i>	3	0	3	<i>Dalopius pallidus</i>	2	1	1
<i>Conotrachelus anaglypticus</i>	2	0	2	<i>Scolytus piceae</i>	3	0	3	<i>Dalopius sp.</i>	2	0	2
<i>Conotrachelus corni</i>	2	1	1	<i>Sitona cylindricollis</i>	1	1	0	<i>Dalopius vagus</i>	1	0	1
<i>Conotrachelus crataegi</i>	2	1	1	<i>Sitona flavescens (lepidus)</i>	2	0	2	<i>Hemicrepidius bilobatus</i>	1	0	1
<i>Conotrachelus elegans</i>	2	0	2	<i>Sitona hispidulus</i>	2	1	1	<i>Hemicrepidius brevicollis</i>	2	1	1
<i>Conotrachelus juglandis</i>	3	0	3	<i>Sitona lineellus</i>	2	1	1	<i>Hemicrepidius hemipodus</i>	2	1	1
<i>Conotrachelus nenuphar</i>	2	1	1	<i>Tomichus piniperda</i>	3	0	3	<i>Hemicrepidius memnonius</i>	2	0	2
<i>Corthylus punctatissimus</i>	3	3	0	<i>Trypodendron lineatum</i>	3	0	3	<i>Hypnoidus abbreviatus</i>	2	0	2
<i>Curculio obtusus</i>	3	1	2	<i>Tychius picirostris</i>	2	0	2	<i>Hypnoidus bicolor</i>	2	2	0
<i>Dendroctonus rufipennis</i>	3	0	3	<i>Xylosandrus germanus</i>	5	1	4	<i>Limonius aeger</i>	2	1	1
<i>Hylastes opacus</i>	3	2	1	<i>Xyloterinus politus</i>	3	3	0	<i>Limonius agonus</i>	4	2	2
<i>Hylastes parvulus</i>	3	2	1	<i>Curculio sulcatus</i>	2	0	2	<i>Limonius confusus</i>	2	0	2
				<i>Xyleborinus saxesenii</i>	1	0	1	<i>Limonius griseus</i>	2	1	1

Liste étendue du nombre de spécimens par famille dont les pattes ont été prélevées (Section 2/2).

Espèces classées par ordre	Nombre de spécimens		Séquences NCBI		Espèces classées par ordre	Nombre de spécimens		Séquences NCBI		Espèces classées par ordre	Nombre de spécimens		Séquences NCBI	
	Non	Oui	Non	Oui		Non	Oui	Non	Oui		Non	Oui	Non	Oui
<i>Limonius subauratus</i>	2	2	0		<i>Vitisella brevicauda</i>	1	0	1		<i>Chinavia hilaris</i>	2	0	2	
<i>Melanotus decumanus</i>	2	0	2		Tephritidae	5	1	4		<i>Euschistus servus euchistoides</i>	3	0	3	
<i>Melanotus hyslopi</i>	2	0	2		<i>Rhagoletis fausta</i>	1	0	1		<i>Euschistus tristigmus luridus</i>	3	0	3	
<i>Melanotus leonardi</i>	2	0	2		<i>Rhagoletis pomonella</i>	3	0	3		Rhopalidae	5	1	4	
<i>Melanotus morosus</i>	2	0	2		<i>Rhagoletis striatella</i>	1	1	0		<i>Arhyssus lateralis</i>	2	0	2	
<i>Melanotus sagittarius</i>	2	0	2		Tipulidae	13	3	10		<i>Arhyssus nigristernum</i>	3	1	2	
<i>Melanotus similis</i>	2	0	2		<i>Nephrotoma alterna</i>	1	0	1		Tingidae	6	3	3	
<i>Melanotus sp.</i>	2	0	2		<i>Nephrotoma ferruginea</i>	3	1	2		<i>Corythucha ciliata</i>	3	3	0	
<i>Oestodes tenuicollis</i>	2	1	1		<i>Nephrotoma pedunculata</i>	1	0	1		<i>Corythucha juglandis</i>	3	0	3	
<i>Sylvanelater cylindriciformis</i>	1	0	1		<i>Tipula furca</i>	3	1	2		HYMENOPTERA	40	21	19	
<i>Limonius basilaris</i>	2	1	1		<i>Tipula paludosa</i>	2	1	1		Argidae	6	3	3	
Nitidulidae	26	15	11		<i>Tipula trivittata</i>	3	0	3		<i>Arge ochropus</i>	3	3	0	
<i>Aethina tumida</i>	2	1	1		HEMIPTERA	77	26	51		<i>Arge pectoralis</i>	1	0	1	
<i>Brassicogethes viridescens</i>	5	0	5		Acanthosomatidae	5	0	5		<i>Schizocerella pilicornis</i>	2	0	2	
<i>Carpophilus brachypterus</i>	2	2	0		<i>Elasmotherus cruciatus</i>	3	0	3		Diprionidae	3	1	2	
<i>Carpophilus dimidiatus</i>	2	0	2		<i>Elasmucha lateralis</i>	2	0	2		<i>Diprion similis</i>	3	1	2	
<i>Carpophilus sayi</i>	2	2	0		Cicadellidae	16	13	3		Siricidae	17	15	2	
<i>Fabogethes nigrescens</i>	2	2	0		<i>Empoasca fabae</i>	1	1	0		<i>Sirex cyaneus</i>	3	3	0	
<i>Glischrochilus fasciatus</i>	3	2	1		<i>Erythroneura tricineta</i>	3	1	2		<i>Sirex nigricornis</i>	3	3	0	
<i>Glischrochilus quadrisignatus</i>	2	2	0		<i>Limotettix sp.</i>	2	2	0		<i>Sirex nitidus</i>	3	3	0	
<i>Glischrochilus sanguinolentus</i>	2	2	0		<i>Limotettix striolus</i>	2	2	0		<i>Sirex noctilio</i>	2	0	2	
<i>Glischrochilus vittatus</i>	4	2	2		<i>Macrostelus divisus</i>	2	2	0		<i>Tremex columba</i>	3	3	0	
Scarabeidae	46	0	46		<i>Paraphlepsius irroratus</i>	2	1	1		<i>Urocera albicornis</i>	3	3	0	
<i>Aphodius fimetarius</i>	2	0	2		<i>Paraphlepsius solidaginis</i>	1	1	0		Tenthredinidae	14	2	12	
<i>Ataenius strigatus</i>	1	0	1		<i>Scaphoideus immistus</i>	1	1	0		<i>Allantus cinctus</i>	2	0	2	
<i>Hoplia trifasciata</i>	3	0	3		<i>Scaphytopius acutus</i>	2	2	0		<i>Caliroa cerasi</i>	2	0	2	
<i>Pelidnota punctata</i>	3	0	3		Coreidae	7	1	6		<i>Cladius difformis</i>	3	0	3	
<i>Phyllophaga anxia</i>	3	0	3		<i>Anasa armigera</i>	2	0	2		<i>Eriocampa juglandis</i>	2	1	1	
<i>Phyllophaga drakii</i>	1	0	1		<i>Anasa tristis</i>	2	0	2		<i>Hoplocampa lacteipennis</i>	2	0	2	
<i>Phyllophaga fraterna fraterna</i>	3	0	3		<i>Leptoglossus occidentalis</i>	3	1	2		<i>Hoplocampa testudinea</i>	1	1	0	
<i>Phyllophaga futilis</i>	3	0	3		Lygaeidae	5	0	5		<i>Monophadnoides geniculatus</i>	1	0	1	
<i>Phyllophaga longispina</i>	3	0	3		<i>Boisea trivittata</i>	3	0	3		<i>Priophorus morio</i>	1	0	1	
<i>Phyllophaga marginalis marginalis</i>	3	0	3		<i>Nysius niger</i>	2	0	2		ORTHOPTERA	5	3	2	
<i>Phyllophaga rugosa</i>	2	0	2		Miridae	13	8	5		Acrididae	4	3	1	
<i>Popillia japonica</i>	3	0	3		<i>Atractotomus mali</i>	1	0	1		<i>Melanoplus femurrubrum</i>	2	2	0	
<i>Serica atracapilla</i>	3	0	3		<i>Lygus lineolaris</i>	2	1	1		<i>Melanoplus punctulatus punctulatus</i>	2	1	1	
<i>Serica sponosa</i>	3	0	3		<i>Lygus punctatus</i>	2	2	0		Gryllidae	1	0	1	
<i>Serica tristis</i>	3	0	3		<i>Lygus rufidorsus</i>	2	1	1		<i>Oecanthus nigricornis</i>	1	0	1	
<i>Phyllophaga vetula</i>	1	0	1		<i>Lygus sp.</i>	2	2	0		Total général	572	191	381	
<i>Serica sericea</i>	3	0	3		<i>Plagiognathus politus</i>	1	0	1						
<i>Amphimallon majalis</i>	3	0	3		<i>Plagiognathus sp.</i>	1	1	0						
DIPTERA	30	8	22		<i>Plagiognathus tumidifrons</i>	2	1	1						
Agromyzidae	5	2	3		Pentatomidae	20	0	20						
<i>Liriomyza huidobrensis</i>	2	2	0		<i>Banasa calva</i>	1	0	1						
<i>Liriomyza trifolii</i>	3	0	3		<i>Banasa dimidiata</i>	4	0	4						
Cecidomyiidae	7	2	5		<i>Brochymena arborea</i>	3	0	3						
<i>Dasineura aceris</i>	3	2	1		<i>Brochymena quadripustulata</i>	2	0	2						
<i>Sitodiplosis mosellana</i>	3	0	3		<i>Euschistus tristigmus</i>	2	0	2						

ANNEXE 8 - Liste des insectes identifiés et des personnes contactées à l'étranger pour obtenir des spécimens exotiques n'ayant pas de barcodes.

Culture	Nom commun	Espèce	Personne à contacter	Adresse courriel
Fraise Framboise Pomme	Wheat bug	<i>Nysius huttoni</i>	The Food and Environment Research Agency (UK) à l'intention de S. Reid et D. Eyre	planthealth.info@fera.gsi.gov.uk
Canneberge	Cranberry root grub	<i>Lichnanthe vulpina</i>	Anne Louise Averill (U Mass)	averill@eco.umass.edu
Canneberge	Green cranberry spanworm	<i>Itame sulphurea</i>	Anne Louise Averill (U Mass)	averill@eco.umass.edu
Fraise	Twobanded Japanese weevil	<i>Pseudocnecorhinus bifasciatus</i>	Amanda C. Hodges (Uflorida)	achodges@ufl.edu
Pomme	Ambrosia beetle	<i>Megaplatypus mutatus</i>	René I. Alfaro	ralfaro@pfc.forestry.ca
Canneberge	Dearness scale	<i>Rhizaspidiotus dearmessi</i>	Sheila Fitzpatrick	sheila.fitzpatrick@agr.gc.ca
Maïs Céréales	Puceron des racines du maïs	<i>Anuraphis maidiradicis</i>	Entomology Department of the University of Minnesota	entodept@umn.edu
Maïs	Charançon du maïs	<i>Sphenophorus maidis</i>	Timothy L. Springer	tim.springer@ars.usda.gov
Soya	Small brown bean bug Petite punaise brune des haricots	<i>Melanacanthus scutellaris</i>	Hugh Brier (Australie)	hugh.brier@daf.qld.gov.au
Maïs Céréales	Cicadelle du maïs	<i>Cicadulina bimaculata</i>	BioNET-EAFRINET Regional Coordinato, Hugh Brier (Australie)	eafrinet@africaonline.co.ke hugh.brier@daf.qld.gov.au
N.d.	Thrips du pois	<i>Frankliniella robusta</i>	Alain Fraval (France)	afraval@orange.fr
Maïs	Grand charançon du maïs	<i>Geraeus senilis</i>	M. D. Salas-Araiza C. W. O'Brien J. Romero-Napoles	salasm@dulcinea.ugto.mx charles.obrien@fam.u.edu jnapoles@colpos.colpos.mx
Maïs	Petit charançon du maïs	<i>Nicentrites testaceipes</i>	Nurnina Nonci	nurnina_nonci@yahoo.com
Maïs	Thrips du maïs	<i>Frankliniella williamsi</i>	Laurence A. Mound Mark S. Hoddle	mark.hoddle@ucr.edu
Canola	Cécidomyie des siliques des crucifères	<i>Dasineura brassicae</i>	Pierre Eric	pierre@supagro.inra.fr
Canola	Nématode des crucifères	<i>Heterodera cruciferae</i>	Howard Ferris	hferris@ucdavis.edu
Canola	Tétranyque	<i>Halotydeus destructor</i>	Paul Umina et Garry McDonald	pumina@unimelb.edu.au gmcd@unimelb.edu.au
Céréales	Cécidomyie des tiges du blé cécidomyie équestre	<i>Haplodiplosis marginata</i>	Pierre Eric Steve Ellis Caroline Nicholls	pierre@supagro.inra.fr steve.ellis@adas.co.uk caroline.nicholls@ahdb.org.uk
Céréales	Scarabée noir du tournesol	<i>Pseudoheteronyx basicollis</i>	Queensland Government, Department of Agriculture and Fisheries, Hugh Brier	callweb@daf.qld.gov.au hugh.brier@daf.qld.gov.au