

# Techniques de prélèvements d'échantillons génétiques pour l'extraction d'ADN nucléaire de Pélobate brun

**Objectifs** : Prélever de l'ADN de la muqueuse buccal, obtenir de l'ADN d'embryons ou de larves, de 30 individus différents par population.

**Informations associées** : lieu, station, sexe, photographie dorsale, date, observateur

Fiche de relevé de terrain puis saisie en ligne

*Prévoir un crayon papier et une solution hydroalcoolique (NF EN 14476)*

## Réalisation des prélèvements buccaux :

Pour optimiser le succès de l'extraction et l'analyse de l'ADN nous demandons d'avoir deux prélèvements (A et B) par individu. Les prélèvements se font en frottant un coton (écouvillon) sur la langue et la paroi buccal d'un individu. Il existe un risque réel de dégradation de l'ADN par les moisissures, c'est pourquoi le prélèvement doit être mis au froid dès que possible (congélateur) et si besoin séché avant à l'air quelques minutes. Les cotons ne doivent pas subir de contaminations : pas d'autres contacts que la paroi buccale ou l'intérieur du tube stérile (ne pas permettre d'autres contacts).

Manipuler le Pélobate le moins longtemps possible et faire le prélèvement sur place. Avoir le matériel nécessaire prêt à l'avance. Si possible manipuler avec des mains humidifiées et à deux personnes.

Tenir entre les doigts deux écouvillons dans leurs tubes.

Ouvrir délicatement la bouche du Pélobate à l'aide d'un objet fin non coupant et non contaminé (pointe de pipette fournie) et introduire l'écouvillon dans la cavité buccale (cf illustration avec une Rainette verte).



Frotter doucement le coton sur et sous la langue et sur la paroi de la cavité, en tournant le coton. Il arrive qu'il y ait un petit saignement, ce qui arrive aussi naturellement lorsque les animaux avalent des insectes à la carapace dure ou piquante !



Réaliser les deux prélèvements à la suite, si possible sans permettre à l'animal de refermer sa bouche, pour éviter d'avoir à la rouvrir.



Remettre immédiatement le coton dans son tube. Prendre une photographie numérique dorsale en vue verticale du Pélobate pour identification et noter sur les tubes A et B une référence unique de la photographie. Cette image servira à contrôler par-après si des prélèvements ont été réalisés par erreur plusieurs fois sur le même individu.



Noter sur le tube la date, le nom du site, le sexe (M, F ou ?) du Pélobate, le nom de l'observateur.

Exemple :

**15/04/15 - Zang - M - EGGERT - 8620 A**

et

**15/04/15 - Zang - M - EGGERT - 8620 B**

Remplir la feuille de prélèvement. Placer les tubes d'une même station dans un sac, une enveloppe ou une boîte à part (= ne pas mélanger les stations). Les tubes A et B peuvent être attachés ensemble ou séparés dans deux sacs (sac "A" et sac "B").



Glande du mâle sur l'avant-bras (ici très marquée, souvent plus discrète !)

Utiliser une nouvelle pointe de pipette pour chaque individu. Attention aux contaminations (ADN sur vos doigts !). L'utilisation de gants en latex à usage unique est possible mais pas obligatoire si le manipulateur est attentif au risque de contamination. Lavage des mains sèches possible entre deux manipulations avec une solution hydroalcoolique (NF EN 14476).

### **Réalisation des prélèvements d'embryons :**

*Prévoir un stylo spécial écriture sur le plastique ou des étiquettes et un crayon papier (ou les deux).*  
Ne pas prélever d'œufs encore frais, la quantité d'ADN nucléaire y est moindre. Attendre d'avoir de jeunes larves sorties de la gelée. Ne pas prendre de gelée. Placer directement une seule larve (larve A) dans un tube Eppendorf contenant de l'alcool à 70 % ou plus. Écrire un numéro unique de ponte (xx-A) sur le couvercle du tube et/ou sur une étiquette collante avec le nom du site et si possible la date. Prendre une deuxième larve (B) de la même ponte, lui attribuer le même numéro de ponte (xx-B). A et B sont nécessairement frère et sœur. Exemple :

**15/06/15 - Mare1Zang - 01A**

Remplir la feuille de prélèvement. Réunir les deux tubes par un ruban adhésif. Placer les tubes d'une même station dans un sac, une enveloppe ou une boîte à part (= ne pas mélanger les stations).

### **Réalisation des prélèvements de tissus sur les larves :**

*Prévoir un stylo spécial écriture sur le plastique ou des étiquettes et un crayon papier (ou les deux), un briquet, un outil coupant.*

Vérifier que le têtard n'a pas déjà fait l'objet d'un prélèvement (trace de la coupe). Prélever à l'aide de ciseaux de dissection ou une lame de rasoir préalablement passés quelques secondes à la flamme (briquet), un petit bout du voile de la nageoire d'une larve, toujours au même endroit (ex ci dessous). Le placer dans un tube Eppendorf contenant de l'alcool à 70 % ou plus. Pas de double prélèvement (B) dans ce cas, car on n'est pas certain d'avoir des frères et sœur. Écrire un numéro unique sur le couvercle du tube et/ou sur une étiquette collante et le nom du site, si possible la date.  
Exemple :

**15/06/15 - Mare1Zang - 02**

Remplir la feuille de prélèvement.

Placer les tubes d'une même station dans un sac, une enveloppe ou une boîte à part.



### Bibliographie

Goldberg, C. S., Kaplan, M. E., and Schwalbe, C. R., 2003, From the frog's mouth: Buccal swabs for collection of DNA from amphibians: *Herpetological Review*, v. 34, iss. 3, p. 220-221.

N. Pidancier, C. Miquel, C. Miaud. Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians. *Herpetological Journal*, 2003, 13, pp.175-178.