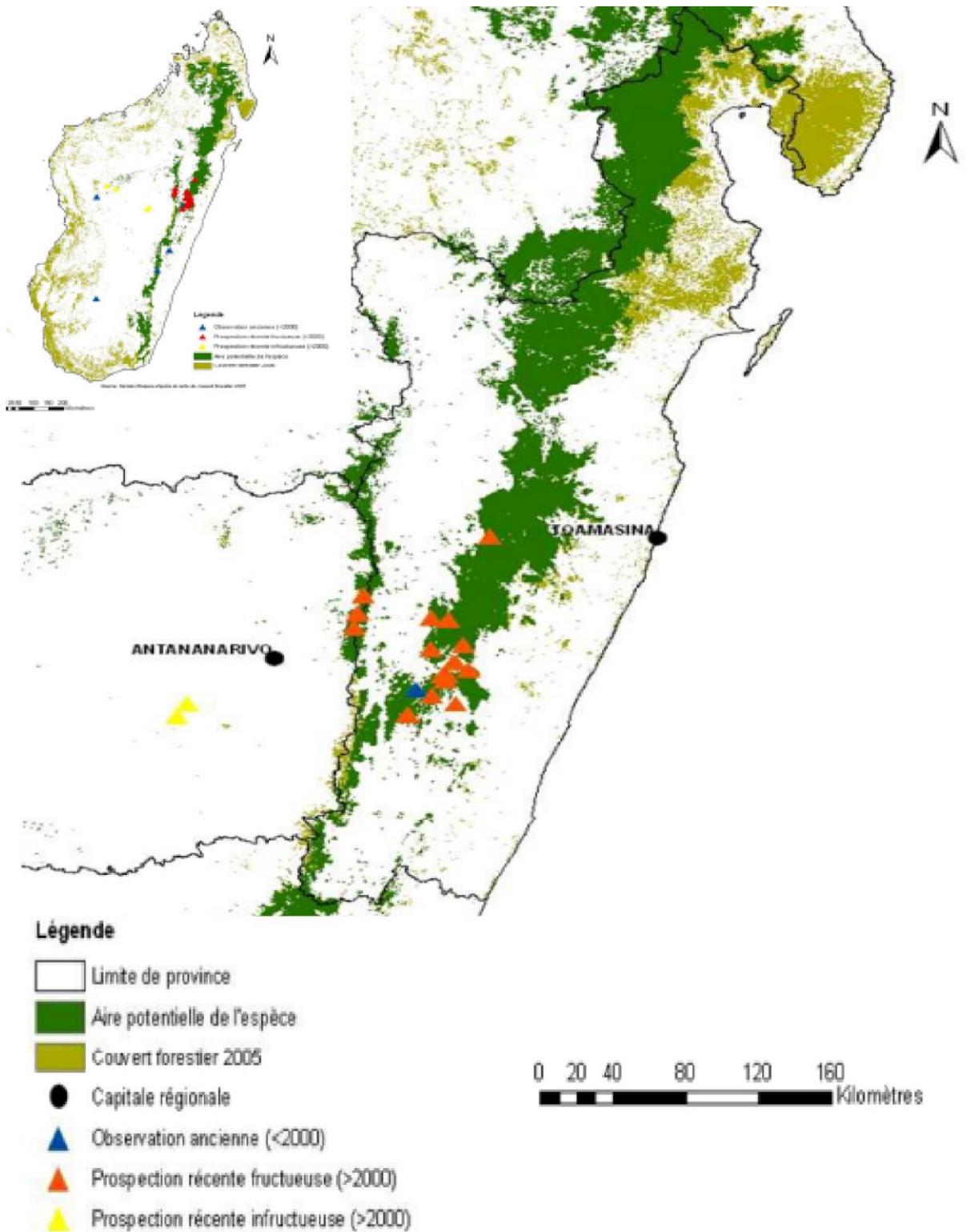
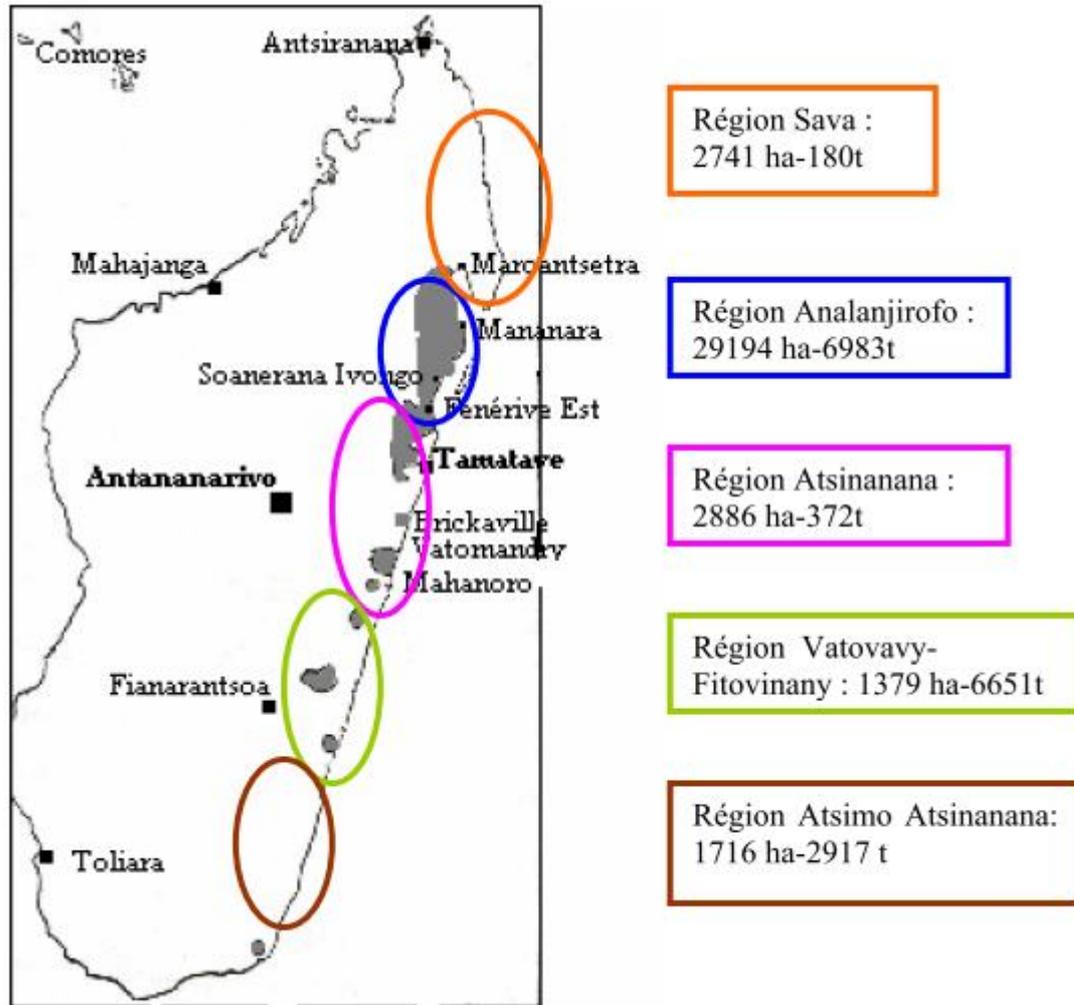


**Annexe 2 : Répartition de *Ravensara aromatica* dans tout Madagascar
(Source Nicolas Roque)**



Annexe 3 : Répartition d'*Eugenia caryophyllata* dans tout Madagascar
(source : Alice Demangel, 2011)



Annexe 4 : Composition de Tampon

1- Tampon de lyse

- SDS 2%
- CTAB 2%
- Tris-HCl 1M
- EDTA 50mM
- β -Mercaptoethanol 1%

2- Composition du Tampon de migration

a. Préparation de 1000ml de solution TBE 10X

mélanger 108g de poudre de Trisma Base, 75g d'Acide borique et 9,4 g de EDTA 0,5M – diluer le mélange dans 1000ml d'eau distillée – ramener le pH du mélange à 8 avec de l'acide chlorhydrique (HCl) – conserver à 4°C

b. Préparation de 1000ml de solution TBE 5X

diluer 50 ml de TBE 10X dans 950 ml d'eau distillée – mélanger – conserver à +4°C

c. Préparation de 1000ml de solution TBE 1X

diluer 100 ml de TBE 10X dans 900 ml d'eau distillée – mélanger – conserver à +4°C

3- Préparation de 100 ml de gel d'agarose 0,8%

diluer 0.8 g de poudre d'agarose dans 100 ml de TBE 5X – chauffer à la micro-onde jusqu'à ce que la solution devienne transparente – laisser refroidir la solution jusqu'à ce qu'elle atteigne la température ambiante – couler la solution dans la cuve électrophorétique horizontale – laisser polymériser durant 15 mn à l'air libre

Annexe 5 : Protocole de migration et de révélation de l'ADN

a. Migration

Consiste à vérifier la présence d'ADN dans la solution ainsi extraite. L'ADN étant ayant une polarité négative, il peut migrer en fonction de sa taille sur un gel d'agarose 0.8% par électrophorèse.

5µl de chaque extrait d'ADN ont été mélangés avec 3µl de bleu de charge (mélange de bleu de bromophénol et de Xylène cyanol FF) afin d'augmenter la densité de l'extrait. Ce mélange a été déposé dans les puits d'inclusion du gel d'agarose. Ce gel a été préalablement confectionné et plongé dans du tampon TBE 0.5X (Tris-Borate-EDTA, pH=8,3) (Annexe 3 b) dans l'électrophorèse horizontale. Le TBE permet le maintien constant du pH du milieu et le passage du courant.

5 µl d'un marqueur de poids moléculaire 1Kb DNA Ladder ont été également déposés de part et d'autre des échantillons, afin de déterminer la taille de l'ADN total des échantillons après la migration.

Le gel a été ensuite soumise à un champ électrique produisant une tension constante de 100V et une intensité d'environ 120 mA, pendant 30 mn.

b. Révélation

Après une migration de 30mn, le gel a été plongé dans un bain de Bromure d'Ethydium ou BET 0.1%, pendant 5mn. Le BET s'intercale entre les bases de l'ADN et fluoresce en rouge orange sous une exposition aux rayons Ultra Violet. La détection des ADN a été ensuite réalisée sur à un transilluminateur à 312nm.

Annexe 6 : Composition de quelques matériels

1- Composition du mix réactionnelle pour le PCR

Eau distillé : 11 μ l
Tampon 10X : 2 μ l
dntp 20 mM : 0.5 μ l
amorces 10 μ M : 1 μ l de chaque
MgCl₂ 25 mM : 2 μ l
BSA 10mg/ml : 0.3 μ l
Taq polymerase 5u/ μ l : 0.2 μ l
Extrait ADN pure : 2 μ l

2- Composition du milieu GSC

Le milieu de gélose Sabouraud Chloremphénicol est un milieu disponible dans le commerce. Il est composé d'agar, de gélose et d'antibiotique. Il est utilisé pour l'isolement de champignon à partir d'explants. Selon la marque, la quantité de milieu nécessaire est variable. Aucun additif autre que de l'eau distillée n'est nécessaire pour la fabrication du milieu. La préparation du milieu consiste à dissoudre le milieu dans de l'eau distillée. L'ensemble est par la suite stérilisé à l'autoclave avant d'être coulé dans des récipients stériles. Le milieu ainsi préparé est utilisé et conservé à froid.

Peptocomplex : 10g/l
Glucose : 40g/l
Chloramphénicol : 0,5g/l
Agar : 15g/l

3- Composition du milieu PDA

Le milieu de potato dextrose agar est un milieu disponible dans le commerce. Il est composé d'agar, de sucre (dextrose) et d'extrait de patate douce. Il est utilisé pour l'isolement de champignon à partir d'explants. Selon la marque, la quantité de milieu nécessaire est variable. Aucun additif autre que de l'eau distillée n'est nécessaire pour la fabrication du milieu. La préparation du milieu consiste à dissoudre le milieu dans de l'eau distillée. L'ensemble est par la suite stérilisé à l'autoclave avant d'être coulé dans des récipients stériles. Le milieu ainsi préparé est utilisé et conservé à froid.

Potato Extract : 5g/l

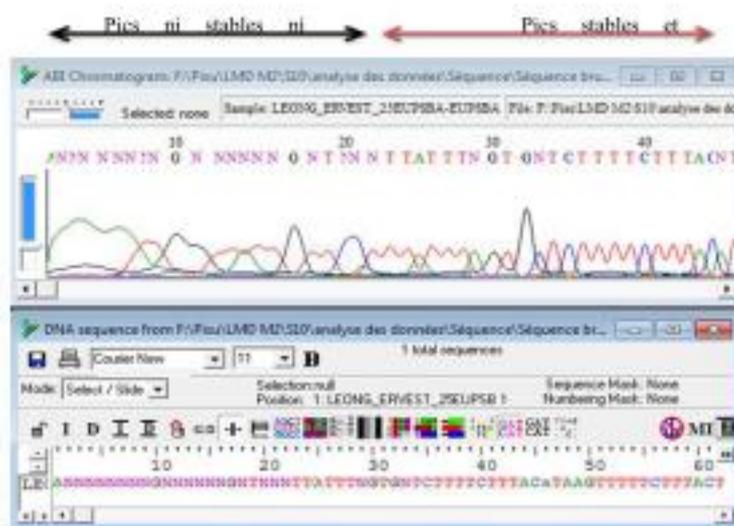
Glucose : 20 g/l

Agar : 17g/l

Annexe 7 : Logiciel de traitement des séquences d'ADN (source : VESTALYS Rojo)

1- Le logiciel BIOEDIT

BioEdit est un logiciel de traitement de séquence. Il a été créé par Hall en 1999 et téléchargeable sur le lien <http://bioedit.software.informer.com/7.2/>. Les résultats de chaque individu sont reçus par courriel et sont sous deux formats de fichiers : l'un .AB1 (les chromatogrammes) et l'autre .SEQ (les séquences). Chaque pic représenté par une couleur est une base. Les premières dizaines de bases ne sont pas vérifiées. La vérification débute lorsque les pics sont constants et stables.



Pics de chromatogramme

Les « N » sont des bases à vérifier au niveau de la séquence. Les bases inscrites en minuscule sont des bases pour lesquelles elles subsistent toujours un doute. La vérification s'arrête lorsque le chromatogramme ne donne plus de pics stables et constants. Pour la vérification, les séquences « reverse » doivent être à la fois mises dans le même sens et transcrites en leurs complémentaires afin d'avoir la même séquence. Les séquences sont enregistrées sous formes FASTA .FAS. La séquence est copiée sur le site <http://reverse-complement.com/> ou un autre qui propose un reverse-complément. Pour l'alignement, les séquences dans les deux sens sont importées : « FILE », « IMPORT DATA », les dossiers contenant les fichiers « forward » et « reverse » sont alignés

avec leurs bases complémentaires. Le fichier final modifié .SEQ peut être enregistré sous format PHYLIP .PHY, texte .TXT, GENBANK .GNK, ou autre.

2- Le logiciel DARWIN

DARwin (Dissimilarity Analysis and Representation for Windows), est un logiciel créé par PERRIER, X., and JACQUEMOUD-COLLET, J.-P en 2006. La version 6.0.11 est une mise à jour de 2015. Il est disponible sur <http://darwin.cirad.fr/>. Son objectif est de déterminer la structure génétique en se basant sur des méthodes de distances (Neighbor Joining). Darwin propose cinq analyses, mais pour notre étude, seules trois parties sont nécessaires : la mesure de la dissemblance, la construction de l'arbre à partir de ces calculs et la représentation de l'arbre. Les données qui peuvent être prises en charge par ce logiciel sont les données quantitatives, les données qualitatives, les données binaires et les séquences nucléotidiques.

Les données utilisées par le logiciel Darwin sont sous format Darwin « .VAR ». Une transformation de format est nécessaire. Un autre composant .DON accompagne cette donnée.

Comme GenAlex, les séquences initiales prises en compte sont Nexus .NEX, Phylip .PHY, Fasta .FAS, Mega2 .MEG. Les séquences sont importées et transformées en .VAR. Lors de cette transformation de format, chaque site est numérisé comme un système identifiant. Ce fichier entre ensuite dans le calcul de dissemblance. DIS. Un fichier .VRD accompagne la matrice. C'est la matrice de distance par Neighbor Joining. Le fichier .DIS, servira pour la construction de l'arbre phylogénétique, avec une possibilité d'utilisation de Bootstrap. L'arbre obtenu est enregistré sous le format .ARB.