

Mr le Préfet de Région
A l'attention de Mathieu METRAL
DREAL Auvergne-Rhône-Alpes
Service Eau Hydroélectricité Nature
Pôle Préservation Milieux Espèces
Unité Loup
5 place Jules Ferry
69006 Lyon

Référence : F254 – Parc Gevaudan

Analyses

Le laboratoire ANTAGENE a réceptionné le 14 août 2018 un lot de 21 échantillons de sang et de tissu correspondant à des loups prélevés au sein du Parc des Loups du Gevaudan.

La méthodologie employée au niveau des techniques de génétique moléculaire et au niveau des analyses statistiques est détaillée en Annexe A ; la qualification et l'expérience du laboratoire ANTAGENE sont détaillés en Annexe B. Les articles scientifiques de référence sur la génétique du loup, les méthodes d'assignation statistiques et les marqueurs génétiques sont listés en Annexe D et E.

Le laboratoire ANTAGENE a procédé à l'extraction/purification d'ADN, a évalué la qualité de l'ADN et a réalisé l'amplification et l'analyse de l'ADN mitochondrial (région de contrôle) et de 23 marqueurs génétiques nucléaires : 22 marqueurs microsatellites et un marqueur de sexe, l'amélogénine (liste complète et références scientifiques en Annexe C)

Des analyses bioinformatiques et statistiques ont été conduites à partir des profils génétiques obtenus pour déterminer:

- l'espèce et l'origine génétique populationnelle
- le profil individuel de l'animal
- la probabilité d'assignation aux populations de référence, notamment de loups français de type italo-alpin (*Canis lupus lupus*) et de chien (*Canis lupus familiaris*) ainsi que l'intervalle de confiance de cette probabilité

Un des objectifs de cette expertise est de comparer les résultats génétiques obtenus sur le lot d'échantillons du Parc du Gevaudan avec les données préalablement obtenues pour les échantillons de deux loups collectés en nature par l'ONCFS dans le département de la Lozère :

Echantillon	N° Antagene
P4817001	582 241
U4817001	582 233

Résultats

Analyses génétiques au niveau de l'ADN mitochondrial

Les séquences de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial obtenus sur l'ensemble des échantillons sont présentées en Annexe F.

Echantillon	N° Antagene	Qualité des séquences d'ADN	Haplotype mitochondrial	GenBank (% identité)
21 échantillons	597 703 à 597 723	+++ (sauf ++ pour 597706 et 597718)	proche W9 (Pilot et al. 2010)	KU696394 (99,8%)

Les 21 échantillons du Parc du Gévaudan présentent tous la même séquence d'ADN mitochondrial. Cet haplotype mitochondrial identique pour les 21 échantillons :

- est proche du type w9 (Pilot et al. 2010) qui est associé aux loups de l'Europe de l'est et eurasiatiques
- et avec une identité génétique de 99,8% avec la séquence GenBank n° KU696394 qui a été décrite sur des loups de Mongolie (Koblmuller et al. 2016).

Le fait que les 21 échantillons possèdent tous exactement le même haplotype mitochondrial montre que ces individus du Parc du Gévaudan sont de même lignée maternelle. Il est possible qu'ils soient tous les descendants d'une seule femelle mais il faudrait connaître le niveau de variabilité des populations d'origine pour pouvoir conclure sur l'apparentement génétique moyen de ces loups.

Echantillon	N° Antagene	Qualité des séquences d'ADN	Haplotype mitochondrial	GenBank (% identité)
P4817001	582 241	+++	W1 (Pilot et al. 2010)	JN182087 (100%)
U4817001	582 233	+++	Proche W1 (Pilot et al. 2010)	JN182087 (99,2%)

Les échantillons P4817001 et U4817001 présentent un haplotype mitochondrial

- identique ou proche du type W1 (Pilot et al. 2010) couramment associé aux populations de loups de l'Europe de l'Est et de Scandinavie, retrouvé dans les populations des pays suivants : pays baltes, Pologne, Biélorussie, Ukraine, Russie et aussi dans les pays scandinaves (Pilot et al. 2010)
- avec une identité génétique de 99,2% et 100% avec la séquence GenBank n° JN182087 qui est identique aux séquences décrites sur des loups provenant de Lituanie et d'Estonie (Hindrikson et al. 2012).

Les échantillons P4817001 et U4817001 présentent une séquence avec des différences au niveau de 3 nucléotides, ce qui atteste que ces 2 échantillons appartiennent à 2 individus différents.

Les 3 séquences mitochondriales, obtenues sur l'ensemble de ces échantillons, diffèrent sans ambiguïté de l'haplotype caractéristique de la population italo-alpine de loups (W22) qui est décrit de façon spécifique en Italie, en Suisse et en France.

Les types mitochondriaux observés sur les 2 échantillons prélevés en nature (W1 ou proche) sont suffisamment différents du type mitochondrial observé sur le lot de 21 loups du Parc du Gévaudan (W9) pour conclure que les 2 loups de Lozère ne présentent pas de proximité génétique au niveau de l'ADN mitochondrial avec les 21 loups du Parc du Gévaudan.

Analyses génétiques au niveau de l'ADN nucléaire

Les empreintes génétiques (combinaison de 22 marqueurs microsatellites dont la liste est fournie en annexe C), le sexe génétique, les résultats d'assignation et le diagnostic sur l'origine génétique sont présentés dans un tableau fourni pour les 23 échantillons (21 échantillons du Parc du Gévaudan et 2 échantillons de Lozère) :

- au format excel : F254-DREAL ARA Parc Gévaudan 23 loups_120918.xlsx
- au format pdf : F254-DREAL ARA Parc Gévaudan 23 loups_120918.pdf

Des empreintes génétiques complètes ou quasi-complètes (21 ou 22 marqueurs sur 22) ont été obtenues pour presque tous les échantillons sauf 4 échantillons, les 3 cadavres en état de putréfaction très avancé du Parc du Gévaudan et l'échantillon d'urine de Lozère :

- ZG-48-18-S044 (597718) : 6 marqueurs sur 22 ; indice qualité de 0,27/1
- ZG-48-18-S045 (597719) : 0 marqueur sur 22 ; indice qualité de 0/1
- ZG-48-18-S046 (597720) : 17 marqueurs sur 22 ; indice qualité de 0,76/1
- U4817001 (582233) : 4 marqueurs sur 22 ; indice qualité de 0,09/1

Les empreintes génétiques sont exploitables pour 20 échantillons sur 23 (19 pour les loups du Parc du Gévaudan et 1 pour la Lozère).

Bien que l'empreinte génétique de l'échantillon U4817001 (582233) ne soit pas exploitable (seulement 4 marqueurs sur 22), deux des marqueurs (AHTk211, REN162C04) sur les 4 analysables diffèrent de ceux de l'échantillon P4817001 (582 241), ce qui confirme l'hypothèse de deux individus différents.

Le niveau de différenciation génétique entre les différents groupes d'animaux est mesuré, sur l'ensemble des marqueurs microsatellites, par l'estimateur F_{st} avec son intervalle de confiance à 95% :

- chien domestique vs population française de loup : $F_{st} = 0,303$ [0,236 – 0,379]
- lot de loups du Parc du Gévaudan vs chien domestique : $F_{st} = 0,161$ [0,116 – 0,206]
- loups du Parc du Gévaudan vs population française de loup : $F_{st} = 0,352$ [0,268 – 0,447]

Ces résultats indiquent un niveau de différenciation génétique élevé ($F_{st} > 0,15$) à très élevé ($F_{st} > 0,30$) entre ces 3 groupes d'animaux. Même si l'effectif est faible pour les loups du Parc du Gévaudan (19 empreintes génétiques exploitables), ce qui peut induire des biais dans l'estimation de la différenciation génétique, ces loups du Parc du Gévaudan sont très distants génétiquement de l'ensemble des loups analysés sur le territoire français.

Les analyses statistiques d'assignation (cf document « F254-DREAL ARA Parc Gévaudan 23 loups_070918 ») montrent que les 19 échantillons exploitables provenant du Parc du Gévaudan ne peuvent pas être assignés :

- ni à une population de chiens domestiques (chiens de race et chiens de village) : probabilité d'assignation comprise entre 0,1% et 3,10% et non significativement différente de 0
- ni à la population française de loups : probabilité d'assignation comprise entre 0,20% et 7,90% (sauf pour un individu à 30,0%) et non significativement différente de 0

Ces loups du Parc du Gevaudan présentant un niveau de différenciation génétique élevé (Fst élevés) par rapport au chien domestique et à la population française de loups, cela justifie d'en faire un ensemble génétique distinct relativement homogène génétiquement.

Les probabilités d'assignation des individus du Parc du Gevaudan à ce groupe sont comprises entre 91,8% et 99,7% à l'exception d'un individu (ZG-48-18-S046 / 597720) qui présente une probabilité d'assignation de 66,8% : soit le résultat est biaisé à cause de l'empreinte génétique incomplète (17 marqueurs sur 22) soit cet individu a un profil génétique sensiblement différent du reste du groupe des loups du Parc du Gevaudan.

Des coefficients d'apparentement ont été calculés sur les 20 empreintes génétiques exploitables provenant du Parc du Gevaudan et de l'échantillon prélevé en nature en Lozère. L'individu de Lozère (P4817001) ne montre aucun lien de parenté avec les 19 loups du Parc du Gevaudan.

Conclusions

Les analyses statistiques conduites à partir des données génétiques obtenues sur l'ADN mitochondrial et sur l'ADN nucléaire montrent :

d'une part que les loups analysés du Parc du Gevaudan

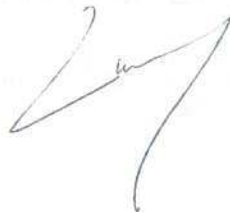
- sont très différents génétiquement de la population française de loups, aussi bien au niveau de l'ADN mitochondrial que de l'ADN nucléaire
- se différencient également du chien domestique
- présentent une signature génétique semblable à celle de loups décrits en Mongolie
- présentent une totale homogénéité génétique au niveau de l'ADN mitochondrial (une seule lignée maternelle)

d'autre part que les deux individus identifiés en nature en Lozère :

- présentent une signature génétique semblable à celle des loups décrits dans les pays baltes
- ne présentent ni proximité génétique (distance génétique élevée) ni apparentement (pas de liens de parenté) avec les loups analysés du Parc du Gevaudan

La Tour de Salvagny, le 12 septembre 2018,

Guillaume QUENEY
Docteur en Génétique



Page 4/16

Annexe A Méthodologie

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

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

Cahier des charges	Méthodes ANTAGENE
Réception et référencement des échantillons	<p>Le laboratoire ANTAGENE attribue un numéro d'identification unique à 6 chiffres à chaque prélèvement (le n° Antagene) et réalise le pointage des échantillons pour confirmer la conformité entre le tableau fourni et les prélèvements physiquement réceptionnés.</p> <p>Ce n° unique d'échantillon (le n° Antagene) permet de garantir la traçabilité des échantillons et des données génétiques produites tout le long de la chaîne de production de la réception des échantillons jusqu'à la délivrance des résultats.</p>
Conservation des échantillons	<p>Les échantillons sont conservés à -20°C dans une zone dédiée au stockage des prélèvements. Les extraits d'ADN sont conservés à -20°C dans une dédiée au stockage des ADN.</p>
Préparation des échantillons	<p>Les échantillons classiques (tissus, sang, frottis buccaux, etc), relativement bien concentrées en ADN, sont traités dans une pièce spécifique. Les échantillons dégradés, contenant de l'ADN en faible quantité (poils, fèces, etc) sont traités dans une pièce spéciale dédiée à l'exploitation des ADN traces (échantillons contenant de l'ADN en faible quantité). Cette pièce est sous UV afin de détruire les éventuels ADN contaminants, est nettoyée à l'eau de javel après chaque expérience et dispose d'un extracteur d'air pour éviter toute contamination ambiante et toute contamination croisée entre échantillons. Les ADN sont préparés, extraits et purifiés de manière à optimiser la concentration d'ADN.</p>
Techniques d'extraction d'ADN	<p>Une fraction de chaque échantillon est lysée et l'ADN est extrait et purifié à l'aide de colonnes constituées d'une matrice échangeuse d'ions (Macherey-Nagel). Cette méthode permet d'obtenir un ADN pur (débarassé des protéines, lipides, molécules inhibitrices, etc) et autorise ensuite l'amplification des marqueurs génétiques et le séquençage de l'ADN avec la meilleure qualité possible. La purification de l'ADN limite la quantité des molécules inhibitrices présentes dans les échantillons, et notamment dans les matières fécales, et qui perturberaient l'amplification des marqueurs génétiques.</p> <p>L'extraction d'ADN est soumise à des contrôles qualité strictes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • d'une part, des témoins négatifs d'extraction sont intégrés afin de confirmer l'absence de toute contamination lors de la préparation des échantillons et de l'extraction des ADN, • d'autre part, des témoins positifs d'extraction sont intégrés afin de s'assurer de l'efficacité de l'extraction et de prévenir d'éventuels problèmes de qualité des ADN extraits.
Techniques PCR	<p>Les ADN sont amplifiés et analysés au niveau d'un panel de 22 marqueurs microsatellites et d'un marqueur de sexe (Amélogénine). Les marqueurs microsatellites et le marqueur de sexe sont amplifiés en utilisant des couples d'amorces spécifiques, chaque couple comportant une amorce fluorescente et</p>

	<p>une amorce classique. Ces marqueurs sont amplifiés selon deux réactions multiplex à l'aide de thermocycleurs et sont analysés sur séquenceur automatique d'ADN (ABI 3130xl, Applied Biosystems) selon la technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ce qui permet d'obtenir pour chaque échantillon un électrophorégramme (fichier graphique représentant la fluorescence des marqueurs).</p>
Nombre de répétitions des PCR	<p>Les marqueurs nucléaires sont amplifiés et analysés plusieurs fois de façon indépendante pour compenser les phénomènes de pertes alléliques (échantillons dégradés) ou de faux allèles :</p> <p>2 répétitions pour les échantillons de tissus 4 répétitions pour les échantillons dégradés (fèces, poils, urine...)</p>
Conditions de réalisation des PCR (prévention contaminations)	<p>Les réactifs (enzymes, amorces d'ADN...) utilisés pour l'amplification des marqueurs génétiques sont préparés dans une zone ultra-propre en surpression accessible par un sas, pour éviter toute contamination ambiante par d'éventuels ADN volatils (pre-PCR).</p> <p>Les étapes d'amplification et de migration sur séquenceur automatique d'ADN sont conduites dans une zone en dépression accessible par deux sas et avec un recyclage permanent de l'air ambiant, afin d'éviter la contamination du reste du laboratoire par des ADN amplifiés naturellement présents en grande quantité et très volatils (post-PCR).</p>
Choix des marqueurs (nombre, type, liste, explications sur le choix)	<p>Caractérisation de 23 marqueurs nucléaires, soit 22 marqueurs microsatellites et 1 marqueur de sexe (l'amélogénine), dont 11 marqueurs microsatellites spécifiquement sélectionnés pour la détection de l'hybridation entre le chien et le loup (Godinho <i>et al.</i> 2011, 2014)</p>
ADN mitochondrial	
Type de séquençage Séquences et références	<p>L'ADN mitochondrial est séquençé dans les deux sens au niveau de la région de contrôle (ou région hypervariable) selon la méthode de séquençage Sanger, en utilisant les amorces de références pour le loup (Vila <i>et al.</i> 1999) :</p> <p>Amorce forward (CR-Thr-L-15926-F) : CAATCCCCGGTCTTGTAACCC Amorce reverse (CR-DL-H-16340-R) : CCTGAAGTAGGAACCAGATG</p>
Méthodes pour interpréter les séquences et pour déterminer la lignée/origine géographique	<p>Toute séquence obtenue est comparée aux bases de données internationales de séquences d'ADN (GenBank) en utilisant le logiciel BLAST. Une première analyse bioinformatique permet de déterminer l'espèce. Si la séquence présente une forte identité génétique avec le chien ou le loup (<i>Canis sp.</i>) alors la séquence est comparée aux données populationnelles des loups en Europe en s'appuyant sur la littérature scientifique, notamment en utilisant la nomenclature utilisée par Pilot <i>et al.</i> (2010) qui numérote les haplotypes mitochondriaux (W1, W2, etc) et sur le ou les articles décrivant toute séquence mitochondriale identique ou proche. Ce travail d'interprétation permet d'associer le type mitochondrial avec une lignée ou une origine géographique. Par exemple, le type W22 décrit par Pilot <i>et al.</i> (2010) est le seul mitotype identifié à grande échelle depuis 20 ans (plusieurs milliers d'échantillons) sur les populations de loup en Italie, Suisse et France. La lignée italo-alpine présente donc une signature génétique très forte avec un mitotype caractéristique de cette zone géographique.</p>
ADN nucléaire	
Méthodes de lecture des résultats	<p>Les données sont pré-interprétées par un logiciel et interprétées par deux analystes de façon indépendante et en aveugle ; la confrontation des deux lectures permet de résoudre les éventuelles données douteuses liés à des artefacts.</p>

<p>Evaluation qualité et seuils</p>	<p>Un indice qualité est calculé pour chaque échantillon en considérant la proportion des allèles correctement génotypés sur l'ensemble des 22 marqueurs microsatellites et pour les différents génotypages de l'approche multi-tubes.</p> <p>Pour un échantillon fortement dégradé, la proportion de marqueurs non amplifiés et de pertes alléliques (absence d'amplification d'un allèle microsatellite) est d'autant plus important que l'ADN est en faible quantité et de faible qualité, ce qui se traduira par une dégradation de l'indice qualité. A contrario, un prélèvement de très bonne qualité pourra présenter une empreinte génétique identique à chaque génotypage et donc un indice qualité de 100%.</p> <p>Etant donné le grand nombre de marqueurs microsatellites (22) et les analyses statistiques réalisées, nous considérons qu'une empreinte génétique consensus est exploitable à partir d'un indice qualité de 0,7 et peut l'être à partir d'un indice qualité de 0,5 en prenant des précautions sur l'interprétation.</p>
<p>Populations de référence</p>	<p>Population de chiens domestiques appartenant à une grande variété de races Population de chiens de village échantillonnés sur les sites de présence du loup en France Population française de loups sur l'ensemble de la zone de distribution en France Et en complément des loups en provenance de différentes régions européennes</p>
<p>Méthodes statistiques d'assignation</p>	<p>La totalité des individus a été analysée statistiquement avec le logiciel d'inférence bayésienne STRUCTURE (Pritchard <i>et al.</i> 2000; Falush <i>et al.</i> 2003) en utilisant le modèle avec hybridation et fréquences alléliques corrélées. Les analyses (burn-in 100 000, longueur de chaîne de Monte-Carlo 500 000) ont été répétées 20 fois chacune pour produire un résultat consensus.</p>
<p>Règles de détection des hybrides</p>	<p>Ces analyses statistiques permettent de déterminer la probabilité d'assignation aux populations de référence et l'intervalle de crédibilité à 95% de cette probabilité. Dès lors que l'intervalle de crédibilité ne recouvre ni la borne 0 (probabilité 0%) ni la borne 1 (probabilité 100%) alors l'échantillon est considéré comme hybride (Bohling 2011). Cette méthode permet de détecter avec fiabilité des hybrides de première génération (F1) et les hybrides de deuxième génération (back-cross).</p>
<p>Méthodes d'analyses d'apparentement</p>	<p>Les empreintes consensus exploitables (indice qualité supérieur ou égal à 0,50) sont comparées deux à deux à l'aide du logiciel ML Relate (Kalinowski 2006) afin de déterminer un coefficient d'apparentement. Ce coefficient est une distance génétique entre individus qui peut permettre d'identifier les parentés proches : parents/enfants, frères/sœurs ou demi-frères/sœurs.</p>
<p>Références bibliographiques</p>	<p>Cf Annexes C et D</p>
<p>Qualification et expérience du laboratoire</p>	<p>Cf Annexe B</p>

Annexe B

Qualification et expérience du laboratoire ANTAGENE

Le laboratoire

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

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

Le laboratoire s'appuie sur :

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

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

La démarche qualité d'ANTAGENE se traduit par :

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

Les infrastructures

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

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

Pour prévenir ces contaminations ambiantes et contaminations croisées, le laboratoire est dédié à l'analyse de l'ADN avec une gestion des flux et une marche en avant rigoureuse.

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

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

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

- une pièce pour traiter les prélèvements dès leur réception,
- une pièce pour préparer les prélèvements classiques, les frottis buccaux, les échantillons de sang, de tissus, de semence, etc
- une pièce pour préparer les prélèvements d'échantillons dégradés (ADN trace) tels que les poils, excréments, fèces, urine, etc
- deux pièces pour réaliser l'extraction d'ADN avec des plateformes dédiées semi-automatisées et automatisées,
- une grande pièce pour stocker l'ADN dans des congélateurs à -20°C (dans des plaques de 96 tubes),
- une zone en surpression (pression positive permanente de l'air, renouvellement d'air indépendant et zone accessible par un sas d'entrée/sortie) garantissant un espace de travail ultra-propre pour préparer les réactifs et les mélanges réactionnels très sensibles, nécessaires à l'amplification de l'ADN,
- plusieurs pièces en atmosphère confinée pour assembler l'ADN et les mélanges réactionnels (travail manuel et automatisé), correspondant à l'étape « pré-PCR » (avant amplification de l'ADN),
- une grande zone en dépression (pression négative permanente de l'air, renouvellement d'air indépendant et zone accessible par un sas d'entrée et un autre sas d'entrée/sortie) garantissant un renouvellement permanent de l'air et équipée avec des thermocycleurs, analyseurs et séquenceurs d'ADN, correspondant à l'étape post-PCR (après amplification de l'ADN) ; la pression négative permet de garder en permanence dans cette zone les ADN amplifiés très volatils et pour empêcher les contaminations des échantillons dans le reste du laboratoire, surtout durant les étapes d'extraction d'ADN et d'amplification de l'ADN.

Les équipements

Outre les installations, ANTAGENE dispose d'équipements spécialisés :

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

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

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

L'expertise

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

ANTAGENE possède une grande expérience dans le développement, le génotypage et l'analyse des marqueurs génétiques, notamment l'ADN mitochondrial, les marqueurs microsatellites et les marqueurs SNP ; et a développé une forte compétence dans l'optimisation moléculaire et le multiplexage des panels de marqueurs génétiques afin de maximiser la qualité et la fiabilité des données génétiques produites.

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

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

L'équipe scientifique et technique

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

Les techniciens supérieurs sont formés et expérimentés

- pour les différentes techniques de génétique moléculaire : préparation des échantillons, extraction/purification d'ADN, amplification de l'ADN par PCR, séquençage, génotypage
- pour l'utilisation des équipements au laboratoire : plateforme d'extraction d'ADN, thermocycleurs, analyseurs d'ADN, séquenceur automatique
- pour les analyses bioinformatiques (lecture et interprétation des marqueurs génétiques)
- pour l'entretien et la maintenance des équipements
- pour la gestion de la qualité et de la traçabilité des échantillons

Les ingénieurs et docteurs sont formés et expérimentés

- pour les analyses bioinformatiques et biostatistiques
- pour l'exploitation des bases de données (banques d'ADN) et de la littérature scientifique
- pour la planification et l'organisation (gestion de projet, approvisionnement)

L'équipe scientifique et technique de 11 personnes s'occupe des analyses génétiques en routine mais contribue également aux activités de recherche & développement, et participe donc à améliorer les techniques d'analyse de l'ADN et les méthodes statistiques d'analyse des données génétiques et des populations sauvages.

Annexe C Marqueurs microsatellites (génomme nucléaire)

Marqueur	Référence
01-AHT103	Holmes et al. 1993
02-AHT111	Holmes et al. 1993
03-AHTk211	Thomas et al. 1997
04-FH2096	Francisco et al. 1996
05-CPH02	Fredholm et al. 1995
06-FH2088	Francisco et al. 1996
07-C09.173	Ostrander et al. 1993
08-CPH05	Fredholm et al. 1995
09-FH2004	Francisco et al. 1996
10-CFX30371	Godinho et al. 2015
11-CXX279	Ostrander et al. 1993
12-C09.250	Ostrander et al. 1993
13-FH2161	Neff et al. 1999, Mellersh et al. 1997
14-FH2140	Neff et al. 1999, Mellersh et al. 1997
15-INU030	Finzymes, inc
16-FH2137	Francisco et al. 1996
17-FH2054	Neff et al. 1999, Mellersh et al. 1997
18-C27.442	Ostrander et al. 1993
19-Dbar1	Kerns et al. 2004
20-REN162C04	Guyon et al. 2003
21-PEZ17	Neff et al. 1999, Mellersh et al. 1997
22-FH2010	Francisco et al. 1996



Annexe D

Références bibliographiques concernant la génétique du loup

Bohling JH, Waits LP (2011) Assessing the prevalence of hybridization between sympatric *Canis* species surrounding the red wolf (*Canis rufus*) recovery area in North Carolina, *Molecular Ecology*, 20-10, 2142-2156

Bohling JH, Adams JR, Waits LP (2013) Evaluating the ability of Bayesian clustering methods to detect hybridization and introgression using an empirical red wolf data set, *Molecular Ecology*, 22-1, 74-86

Fabbri E, Caniglia R, Kusak J, Galov A, Gomercic T, Arbanasic H, Huber D, Randi E (2014) Genetic structure of expanding wolf (*Canis lupus*) populations in Italy and Croatia, and the early steps of the recolonization of the Eastern Alps, *Mammalian Biology*, 79-2, 138-148

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587

Godinho R, Llaneza L, Blanco JC, Lopes S, Alvares F, Garcia EJ, Palacios V, Cortes Y, Talegon J, Ferrand N (2011). Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, 20, 5154-5166

Godinho R, Lopez-Bao JV, Castro D, Llaneza L, Lopes S, Silva P, Ferrand N (2014). Real-time assessment of hybridization between wolves and dogs: combining non-invasive samples with ancestry. *Molecular Ecology Resources*, 15, 317-328

Hindrikson M, Männil P, Ozolins J, Krzywinski A, Saarma U (2012) Bucking the trend in wolf-dog hybridization: first evidence from Europe of hybridization between female dogs and male wolves. *PLoS One*. 2012;7(10):

Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23, 1801-6

Koblmüller S, Vila C, Lorente-Galdos B, Dabad M, Ramirez O, Marques-Bonet T, Wayne RK and Leonard JA (2016) Whole mitochondrial genomes illuminate ancient intercontinental dispersals of grey wolves (*Canis lupus*) *Journal of Biogeography*, 43, 1728-1738

Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006). ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6:576-579.

Miquel C, Bellemain E, Poillot C (2006) Quality indexes to assess the reliability of genotypes in studies using noninvasive sampling and multiple-tube approach, *Molecular Ecology*, 6-4, 985-988

Pires AE, Ouragh L, Kalboussi M, Matos J, Petrucci-Fonseca F, Brudford MW (2006) Mitochondrial DNA sequence variation in Portuguese native dog breeds: diversity and phylogenetic affinities, *Journal of Heredity*, 4, 318-330

Pilot M, Branicki W, Jedrzejewski W, Goszczyński J, Jedrzejewska B, Dykyy I, Shkvyrya M, Tsingarska E. (2010) Phylogeographic history of grey wolves in Europe. BMC Evol Biol. 2010 Apr 21;10:104

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. Genetics, 155, 945-959

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

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

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

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

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

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

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

Annexe E

Références bibliographiques concernant les marqueurs génétiques du loup

Ostrander EA, Sprague GF, Rine J. Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA) markers for genetic mapping in dog. *Genomics* 1993 16: 207-213.

Holmes N, Humphreys S, Binns M, Holliman A, Curtis R, Sampson J. Isolation and characterization of microsatellites from the canine genome. *Animal Genetics* 1993 24: 289-292.

Fredholm M, Winterø A. Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mammalian Genome* 1995 6: 11-18.

Francisco L, Langsten A, Mellersh C, Neal C, Ostrander E. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome* 1996 7: 359-362.

Thomas R, Holmes N, Fischer P, Dickens H, Breen M, Sampson J, Binns MM. Eight canine microsatellites. *Animal Genetics* 1997 28: 153-154.

Valiere N, Taberlet P. Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Mol Ecol* 2000, 9, 2149-2154.

Guyon R, Lorentzen TD, Hitte C, Kim L, Cadieu E, et al Guyon R, Lorentzen TD, Hitte C, Kim L, Cadieu E, Parker HG, Quignon P, Lowe JK, Renier C, Gelfenbeyn B, Vignaux F, DeFrance HB, Gloux S, Mahairas GG, André C, Galibert F, Ostrander EA. A 1-Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003 100: 5296-5301.

Kerns JA, Newton J, Berryere TG, Rubin EM, Cheng JF, Schmutz SM, Barsh GS. Characterization of the dog Agouti gene and a nonagouti mutation in German Shepherd Dogs. *Mamm Genome*. 2004 Oct;15(10):798-808.

Cho GJ. Microsatellite Polymorphism and Genetic Relationship in Dog Breeds in Korea. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2005. Vol 18, No. 8 : 1071-1074

Randi E, Hulva P, Fabbri E, Galaverni M, Galov A, Kusak J, Bigi D, Černá Bolfíková B, Smetanová M, Caniglia R. Multilocus Detection of Wolf x Dog Hybridization in Italy, and Guidelines for Marker Selection. *PLoS One*. 2014; 9(1): e86409.

Godinho R, Lopez-Bao JV, Castro D, Ilaneza L, Lopes S, Silva P, Ferrand N. Real-time assessment of hybridization between wolves and dogs: combining noninvasive samples with ancestry informative markers. *Mol Ecol Res* 2014 doi: 10.1111/1755-0998.12313.

Annexe F

Séquences de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial

21 échantillons (597703 à 597723)

(proche 99,8% GenBank KU696394)

TCAATCCCCGCTCTGTAAACCAAAAATGGAGAGTAACCGCCCTCCCTAAGACTCAAGGAAGAAGCTCTTGCTCCACCATCAGCAC
CCAAAGCTGAAATCTCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCA
GGTAAACCCCTTCCCTCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTATATCCTTAC
ATAGGACATATTAACCAATCTCATAGTTCACTGATCTATCAACAGTAATCGAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTAATCA
CCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAA
ACTATACCTGGCATCTGGTTCCTTACTTCAGGA

P4817001 (582 241) (identique 100% GenBank JN182087)

AGCTCTTGCTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATCTCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCT
ACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAACCCCTTCTCCCTCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCATGCATATAAGCA
TGTACATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAACCAATCTCATAATTCATGATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACT
TAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATACTA
ACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATACCTGGCATCTGGTTC

U4817001 (582 233) (proche 99,2% GenBank JN182087)

AGCTCTTGCTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATCTCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCT
ACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAACCCCTTCTCCCTCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCATGCATATAAGCA
TGTACATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAACCAATCTCATAATTCATGATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACT
TAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATACTA
ACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATACCTGGCATCTGGTTC

(Différences nucléotidiques en rouge)

P4817001 (582 241) : AGCTCTTGCTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATCTCTTAAACTATTCCCTGACAC
U4817001 (582 233) : AGCTCTTGCTCCACCATCAGCACCCAAAGCTGAAATCTCTTAAACTATTCCCTGACAC

P4817001 (582 241) : CCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAACCC
U4817001 (582 233) : CCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAACCC

P4817001 (582 241) : TTCTCCCTCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCATGCATATAAGCATGTA
U4817001 (582 233) : TTCTCCCTCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCATGCATATAAGCATGTA

P4817001 (582 241) : CATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAACCAATCTCATAATTCATGATCTATC
U4817001 (582 233) : CATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAACCAATCTCATAATTCATGATCTATC

P4817001 (582 241) : AACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAA
U4817001 (582 233) : AACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAA

P4817001 (582 241) : ACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATACTAACGTGGGGG
U4817001 (582 233) : ACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATACTAACGTGGGGG

P4817001 (582 241) : TTAATCATGAAACTATACCTGGCATCTGGTTC
U4817001 (582 233) : TTAATCATGAAACTATACCTGGCATCTGGTTC

Référence échantillon	N° Antigène	00-Clu-Amelo-A	00-Clu-Amelo-B	01-AHT103	02-AHT111	03-AHTk211	04-FH2096	05-CPH02	06-FH2088	07-C09.173	08-CPH05	09-FH2004	10-CFX30371	11-CXXZ79	12-C09.250	13-FH2161	14-FH2140	15-INU030	16-FH2137	17-FH2054	18-C27.442	19-Dbar1	20-REN162C04	21-PEZ17	22-FH2010	Commentaire		
ZG-48-18-S002	597703	901902	901902	086100	098102	090090	096100	116116	096132	130136	127129	293309	172172	108112	162166	000000	130130	146148	157165	149153	184186	222243	199201	206214	241245	1	22	
ZG-48-18-S002	597703	901902	901902	086100	098102	090090	096100	116116	096132	130136	127129	293309	172172	108112	162166	000000	130156	146148	157165	149153	184186	222243	199201	206214	241245			
ZG-48-18-S004	597704	901902	901902	098104	098106	088092	096100	116116	128128	126130	129135	239321	172172	112112	162166	225245	131136	140146	165185	145149	184184	222243	201205	202206	245249	2	24	
ZG-48-18-S004	597704	901902	901902	098104	098106	088092	096100	116116	128128	126130	129135	239321	172172	112112	162166	225245	131136	140146	165185	145149	184184	222243	201205	202206	245249			
ZG-48-18-S006	597705	901901	901901	086098	098102	090090	096100	116116	112112	130136	127135	293309	172172	108112	162166	241241	136156	146148	157167	149153	184186	222243	201205	202206	245249	3	24	
ZG-48-18-S006	597705	901901	901901	086098	098102	090090	096100	116116	112112	130136	127135	293309	172172	108112	162166	241241	136156	146148	157167	149153	184186	222243	201205	202206	245249			
ZG-48-18-S007	597706	902902	901902	100104	098098	090092	100100	112116	128132	126126	129135	239309	172172	108112	162166	000000	136136	140144	165165	149157	182186	222226	205211	206214	241249	4	22	
ZG-48-18-S007	597706	901902	901902	100104	098098	090092	100100	112116	128132	126126	129135	239309	172172	108112	162166	225249	136136	140144	165165	149157	182186	222226	205211	206214	241249			
ZG-48-18-S008	597707	901901	901901	098104	098106	092092	100100	116116	128128	126126	129135	309321	172172	112120	164166	225249	136136	140148	165185	149149	184186	222222	199205	202206	249249	5	24	
ZG-48-18-S008	597707	901901	901901	098104	098106	092092	100100	116116	128128	126126	129135	309321	172172	112120	164166	225249	136136	140148	165185	149149	184186	222222	199205	202206	249249			
ZG-48-18-S009	597708	901902	901902	098098	098098	088088	100100	116116	128132	124130	129135	301321	172172	112112	162166	225249	136136	140144	157165	149149	184186	000000	201205	202202	249249	6	23	
ZG-48-18-S009	597708	901902	901902	098098	098098	088088	100100	116116	128132	124130	129135	301321	172172	112112	162166	225249	136136	140144	157165	149149	184186	000000	201205	202202	249249			
ZG-48-18-S010	597709	901902	901902	098098	098106	088092	096096	116116	112118	124130	129135	239293	172172	112112	162166	000000	146148	157185	145149	184184	222222	201205	202202	241249	7	22		
ZG-48-18-S010	597709	901902	901902	098098	098106	088092	096096	116116	112118	124130	129135	239293	172172	112112	162166	000000	146148	157185	145149	184184	222222	201205	202202	241249				
ZG-48-18-S012	597710	901901	901901	100104	098108	084090	096096	112118	096132	124126	135135	301305	172172	112120	166166	241241	131156	136136	157165	153176	180186	222222	205205	206214	245249	8	24	
ZG-48-18-S012	597710	901901	901901	100104	098108	084090	096096	112118	096132	124126	135135	301305	172172	112120	166166	241241	131156	136136	157165	153176	180186	222222	205205	206214	245249			
ZG-48-18-S016	597711	901901	901901	098100	098102	088090	096096	116116	112132	124130	127129	293301	172172	112112	166166	241241	136156	146148	157157	149149	184186	222222	201205	202214	241249	9	24	
ZG-48-18-S016	597711	901901	901901	098100	098102	088090	096096	116116	112132	124130	127129	293301	172172	112112	166166	241241	136156	146148	157157	149149	184186	222222	201205	202214	241249			
ZG-48-18-S017	597712	000000	901901	098098	102106	088088	000000	000000	112128	000000	000000	239301	172172	000000	000000	000000	000000	140146	000000	000000	184186	222222	201205	000000	241249	10	12	
ZG-48-18-S017	597712	901901	901901	098098	102106	088088	096096	116116	112128	126130	127135	239301	172172	112112	166166	225241	131136	140146	157185	149149	184186	222222	201205	202202	241249			
ZG-48-18-S019	597713	901901	901901	098104	102106	088088	096096	116116	128132	124126	129135	239293	172172	112112	166166	000000	000000	146146	157185	145149	184184	222222	201201	202202	241249	11	22	
ZG-48-18-S019	597713	901901	901901	098104	102106	088088	096096	116116	128132	124126	129135	239293	172172	112112	166166	241245	131156	146146	157185	145149	184184	222222	201201	202202	241249			
ZG-48-18-S025	597714	901902	901902	086100	098106	090092	096096	116116	096112	126130	129135	293305	172172	112128	162168	225241	136136	140144	165165	149149	180186	243243	199199	202214	245245	12	24	
ZG-48-18-S025	597714	901902	901902	086100	098106	090092	096096	116116	096112	126130	129135	293305	172172	112128	162168	225241	136136	140144	165165	149149	180186	243243	199199	202214	245245			
ZG-48-18-S027	597715	901902	901902	098098	098102	090092	096100	112116	096112	124136	129135	293309	172172	108112	162166	241249	131136	144146	157165	149153	184186	222222	199201	202202	245249	13	24	
ZG-48-18-S027	597715	901902	901902	098098	098102	090092	096100	112116	096112	124136	129135	293309	172172	108112	162166	241249	131136	144146	157165	149153	184186	222222	199201	202202	245249			
ZG-48-18-S028	597716	901902	901902	098100	098098	084090	096100	116116	128132	124126	127135	293321	172172	108112	162166	225241	131136	144146	157185	149153	186186	222222	199201	202214	245249	14	24	
ZG-48-18-S028	597716	901902	901902	098100	098098	084090	096100	116116	128132	124126	127135	293321	172172	108112	162166	225241	131136	144146	157185	149153	186186	222222	199201	202214	245249			
ZG-48-18-S033	597717	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	15	0
ZG-48-18-S033	597717	901901	901901	098104	098102	088092	096100	112116	128128	126130	135135	239309	172172	112112	162166	225249	136136	140148	165185	149153	184186	222222	199205	202206	249249			
ZG-48-18-S044	597718	000000	901901	000000	000000	000000	096100	000000	000000	000000	000000	000000	172172	108112	166166	000000	000000	000000	000000	000000	000000	222222	000000	000000	000000	16	6	
ZG-48-18-S044	597718	000000	901901	000000	000000	000000	096100	000000	000000	000000	000000	000000	172172	108112	166166	000000	000000	000000	000000	000000	184186	222222	000000	000000	000000	contaminé		
ZG-48-18-S045	597719	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	17	0	
ZG-48-18-S045	597719	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000			
ZG-48-18-S046	597720	901902	901902	098098	098106	084092	096100	000000	096132	000000	127129	000000	172172	108128	166166	000000	000000	146150	165165	145153	180184	226230	199199	202202	241245	18	16	
ZG-48-18-S046	597720	901902	901902	098098	098106	084092	100100	000000	096132	000000	127129	000000	172172	108108	162166	000000	000000	146150	165165	145153	180184	226230	199199	202202	241245			
ZG-48-18-S055	597721	901902	901902	098100	098098	088090	096096	116116	128132	130130	129129	239301	172172	112112	162166	225241	131136	146146	157185	145149	184186	243243	201205	202214	241245	19	24	
ZG-48-18-S055	597721	901902	901902	098100	098098	088090	096096	116116	128132	130130	129129	239301	172172	112112	162166	225241	131136	146146	157185	145149	184186	243243	201205	202214	241245			
ZG-48-18-S056	597722	901902	901902	100104	102106	088088	096100	116116	112128	130130	129129	293321	172172	112112	162166	225241	131156	146146	157185	145149	184186	222222	201205	206214	249249	20	24	
ZG-48-1																												