

Protocole standardisé des procédures de stérilisation et d'échantillonnage d'eau afin de déterminer la présence d'espèces fauniques dans les milieux hydriques par l'analyse d'ADNe au Québec

Juillet 2021

MINISTÈRE DES FORÊTS, DE LA FAUNE ET DES PARCS



Photographie de la page couverture :

Échantillonnage ADNe – Communauté de poissons du fleuve Saint-Laurent © Yves Paradis, ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP)

Crédits des autres photographies :

Page 5, figure 1 : Matériel requis pour la filtration d'un échantillon d'eau à l'aide d'une pompe
© Sarah Aubé, MFFP

Page 5, figure 2 : Matériel requis pour la filtration d'un échantillon d'eau à l'aide d'une seringue
© Sarah Aubé, MFFP

Page 11, figure 3 : Matériel de décontamination © Groupe de travail canadien sur la santé de l'herpétofaune

La version intégrale de ce document est accessible à l'adresse suivante :

mffp.gouv.qc.ca/documents/faune/PT_standardise_sterilisation_echantillonnage_eau_ADNe.pdf

© Gouvernement du Québec

Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs

Dépôt légal - Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2021

ISBN (PDF) : 978-2-550-89814-6

Équipe de réalisation

Rédaction

| | |
|---|---|
| Sonia Labrecque, biologiste | Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP), Service de la conservation de la biodiversité et des milieux humides (SCBMH) |
| Patrick Charbonneau, biologiste, M. Sc. | MFFP, SCBMH |

Révision

| | |
|--|--|
| Sarah Aubé, technicienne de la faune | MFFP, Service de la gestion des habitats aquatiques et de la production piscicole (SGHAPP) |
| Anne-Marie Béland, technicienne de la faune | MFFP, SCBMH |
| Guillaume Côté, biologiste, M. Sc. Responsable du laboratoire ADNe | MFFP, Service de la gestion des espèces aquatiques (SGEA) |
| Kimberley Desgagné, biologiste | MFFP, DEFTHA |
| Christine Dumouchel, biologiste, M. Env. | MFFP, SCBMH |
| Anne-Marie Gosselin, biologiste Chef d'équipe – Division de la biodiversité | MFFP, SCBMH |
| Yanick Soulard, technicien de la faune | MFFP, SGHAPP |

Remerciements

Nous remercions les techniciens de la faune et les biologistes des directions régionales de la gestion de la faune (DGFa), de la Direction de l'expertise sur la faune aquatique (DEFA) et de la Direction de l'expertise sur la faune terrestre, l'herpétofaune et l'avifaune (DEFTHA) du MFFP, qui ont lu et commenté ce protocole.

Référence à citer

MINISTÈRE DES FORÊTS, DE LA FAUNE ET DES PARCS (2021). *Protocole standardisé des procédures de stérilisation et d'échantillonnage d'eau afin de déterminer la présence d'espèces fauniques dans les milieux hydriques par l'analyse d'ADNe au Québec*, gouvernement du Québec, Québec, 13 p.

Registre du document et des mises à jour

| Date | Version | Nature du document/des modifications | Chargé de projet |
|--------------|---------|--------------------------------------|---------------------|
| Juillet 2021 | 01 | Première version officielle | Patrick Charbonneau |

Avant-propos

Ce document a été écrit dans le but d'accompagner les biologistes et techniciens de la faune du ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, les consultants et les acteurs du milieu dans la réalisation d'inventaires utilisant la méthode de détection d'espèces par l'ADN environnemental (ADNe). Il s'inspire des dernières publications réalisées dans le domaine (Laramie et coll., 2015; Carim et coll., 2016; British Columbia Ministry of Environment, 2017; US Fish and Wildlife Service, 2019).

Les procédures de stérilisation du présent document ont été élaborées pour des campagnes d'échantillonnage d'eau ayant comme objectif de déterminer la présence d'une espèce faunique dans des milieux hydriques à l'aide de la méthode d'extraction de l'ADNe.

Les personnes qui réaliseront des échantillonnages d'eau dans cette optique doivent s'assurer d'utiliser une version à jour du présent document, accessible à l'adresse suivante :

mffp.gouv.qc.ca/documents/faune/PT_standardise_sterilisation_echantillonnage_eau_ADNe.pdf

Les procédures de stérilisation sont également destinées à être utilisées lors d'études d'impacts ou d'autres projets nécessitant de l'échantillonnage d'eau pour effectuer des analyses d'ADNe. En aucun cas des modifications ne doivent être apportées aux procédures de stérilisation puisque ces modifications peuvent compromettre les résultats obtenus.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Introduction | 1 |
| Mise en contexte..... | 1 |
| Définitions..... | 1 |
| Site d'échantillonnage..... | 1 |
| Station d'échantillonnage..... | 1 |
| Objectifs..... | 2 |
| Limites et mises en garde | 2 |
| Limites du protocole..... | 2 |
| Solution pour stériliser le matériel..... | 2 |
| Faux positif..... | 3 |
| Faux négatif..... | 3 |
| Méthodologie | 4 |
| Matériel..... | 4 |
| Trousse d'échantillonnage..... | 5 |
| <i>Filtration avec pompe</i> | 5 |
| <i>Filtration avec une seringue</i> | 5 |
| Stérilisation..... | 6 |
| Échantillonnage..... | 7 |
| Blanc de glacière..... | 7 |
| Manipulations sur le terrain..... | 7 |
| <i>Milieu hydrique lentique</i> | 7 |
| Embarcation..... | 7 |
| Berge..... | 8 |
| <i>Milieu hydrique lotique</i> | 8 |
| Embarcation..... | 8 |
| Berge..... | 8 |
| Blanc de terrain..... | 8 |
| Filtration..... | 9 |
| Laboratoire..... | 9 |
| Cas particuliers..... | 9 |
| Prévention de la propagation des maladies et des espèces exotiques envahissantes | 10 |
| Élimination des organismes..... | 10 |
| Désinfection du matériel..... | 11 |
| Matériel..... | 11 |
| Véhicules et embarcations..... | 11 |
| Références | 13 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----------|
| Tableau 1. Méthodes de décontamination proposées | 10 |
|---|-----------|

Liste des figures

| | |
|--|-----------|
| Figure 1. Matériel requis pour la filtration d'un échantillon d'eau à l'aide d'une pompe | 5 |
| Figure 2. Matériel requis pour la filtration d'un échantillon d'eau à l'aide d'une seringue | 5 |
| Figure 3. Matériel de décontamination | 11 |

Introduction

Mise en contexte

La détection d'espèces par l'ADN¹ environnemental (ADNe) est une technique récente qui permet de recueillir une quantité inestimable d'informations avec un minimum d'effort (Carim et coll., 2016; British Columbia Ministry of Environment, 2017). Cependant, afin d'assurer l'exactitude des résultats, des précautions doivent être prises pour limiter les risques de contamination lors des différentes manipulations, et ce, autant sur le terrain qu'en laboratoire. Il y a contamination lorsqu'un échantillon entre en contact avec une source d'ADN qui n'est pas présente dans le milieu et crée un faux positif. À l'opposé, un faux négatif a lieu lorsque l'ADN récolté est dégradé par la solution utilisée pour stériliser le matériel. Ainsi, sans les précautions énumérées dans ce document, les résultats peuvent être faussés. Le temps et les budgets investis pour l'échantillonnage et l'analyse des échantillons sont alors perdus. De plus, si la contamination n'est pas prise en compte, il y a une possibilité d'interpréter des données incohérentes et d'engager des actions de gestion basées sur des résultats erronés. On comprend donc toute l'importance des procédures de stérilisation afin de s'assurer que les méthodes de prospection et de suivi des espèces animales sont valides.

Tout d'abord, il faut savoir que, lorsque l'on procède à l'échantillonnage d'eau en vue d'extraire l'ADNe, tout ce qui entre en contact avec le matériel d'échantillonnage est une source potentielle de contamination. En effet, l'ADN peut subsister sur le matériel lorsque les conditions s'y prêtent (Laramie et coll., 2015).

Dans ce cadre d'échantillonnage, les sources de contamination les plus fréquentes sont les suivantes : les mains, les vêtements (bottes, imperméable, veste de flottaison, etc.), le matériel à usage multiple (pince, pompe, perche, etc.), l'embarcation et le véhicule de transport (camion, VTT, motoneige, etc.). Également, la contamination peut survenir à plusieurs moments lors de l'échantillonnage (filtration, préservation, extraction, etc.).

Définitions

Site d'échantillonnage

Le site d'échantillonnage consiste en un milieu hydrique (p. ex., rivière, lac ou étang). L'emplacement des stations d'échantillonnage à l'intérieur des limites du site d'échantillonnage doit favoriser les chances de détection de l'espèce visée. Il est donc recommandé de consulter des spécialistes de l'ADNe et de l'espèce visée lors de l'élaboration de la stratégie d'échantillonnage.

Station d'échantillonnage

Une station d'échantillonnage est l'endroit où le prélèvement d'un échantillon d'eau est effectué à l'intérieur des limites du site d'échantillonnage.

¹ ADN : Acide désoxyribonucléique.

Objectifs

Le présent document a comme objectifs de :

- Sensibiliser les techniciens et les biologistes aux risques de contamination lors de campagnes d'échantillonnage d'eau pour en extraire l'ADNe;
- Décrire les bonnes pratiques à mettre de l'avant afin de diminuer le risque de contamination.

Limites et mises en garde

Limites du protocole

L'approche d'analyse par ADNe s'applique uniquement pour des campagnes d'échantillonnage d'eau ayant comme objectif de déterminer la présence d'une espèce faunique dans des milieux hydriques. Les procédures décrites dans le présent document ne s'appliquent pas si l'objectif de l'échantillonnage est de déterminer les secteurs précis utilisés par une espèce à l'intérieur d'un même milieu hydrique (p. ex., lac ou rivière) ou de calculer l'abondance relative d'une espèce.

Les échantillons d'eau pour l'extraction d'ADNe doivent toujours être prélevés en premier lorsque plusieurs manipulations sont prévues lors de l'échantillonnage. Ainsi, lorsqu'il n'est pas possible de stériliser du matériel (p. ex., filet, trappe, etc.), le risque de contamination des échantillons d'eau sera minimisé. Le séchage du matériel ne peut pas être utilisé comme technique de stérilisation puisque l'ADN demeure présent sur le matériel même lorsqu'il est sec (Laramie et coll., 2015) et peut donc contaminer un échantillon d'eau.

Il est considéré que tout peut potentiellement contaminer les échantillons et ainsi compromettre la validité des résultats. Il est donc recommandé d'arrêter l'échantillonnage et de le recommencer si une contamination est suspectée. Ainsi, des trousse d'échantillonnage supplémentaires (*back-up*) devraient être emportées lors des campagnes d'échantillonnage.

Les présentes procédures n'incluent pas de méthodologies pour l'inventaire d'une espèce en particulier. Ainsi, le nombre d'échantillons, la profondeur d'échantillonnage, l'emplacement des stations d'échantillonnage ou toute autre exigence méthodologique spécifique à l'espèce ne sont pas précisés. L'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage pourra être faite en collaboration avec des spécialistes de l'ADNe et de l'écologie de l'espèce visée.

Solution pour stériliser le matériel

L'objectif de la stérilisation est d'éliminer toute trace d'ADN qui pourrait subsister sur le matériel des trousse d'échantillonnage et sur les équipements. Pour désinfecter ce matériel, une solution à base d'eau potable et d'eau de Javel² doit être produite. La concentration (10 ou 20 %) de cette solution dépend du matériel qui doit être désinfecté. Cette solution de stérilisation doit être renouvelée tous les jours puisque son efficacité n'est que de 24 h. Par contre, pour des raisons logistiques ou

² Concentration d'hypochlorite de sodium variant entre 3 et 6 %, en vente libre dans les commerces.

environnementales, on peut avoir recours à une solution 2 % de Virkon^{MC} Aquatic s'il n'est pas possible d'utiliser la solution avec de l'eau de Javel.

Puisque l'emploi d'une solution de stérilisation est à prioriser, il est conseillé de nettoyer le matériel à l'entrepôt ou au laboratoire lors de sa préparation, avant la campagne d'échantillonnage lorsque cela est possible.

Après la stérilisation, le matériel doit être rincé à l'eau. L'eau distillée est nécessaire pour le matériel entrant en contact direct avec l'ADNe (p. ex., bouteille, filtre), alors que le reste du matériel peut être rincé avec de l'eau potable du robinet. L'eau du site d'échantillonnage peut être utilisée pour le rinçage lorsque l'eau potable n'est pas disponible.

Le matériel doit être exempt de saleté (p. ex., boue, végétation) avant l'emploi de la solution de stérilisation. Il doit être rincé à l'eau potable avant les étapes de stérilisation. Il est à noter que le rinçage ne remplace pas les étapes de stérilisation.

Faux positif

Les procédures de stérilisation doivent être respectées afin d'éviter qu'il y ait une contamination des échantillons d'eau. Celle-ci a lieu lorsqu'un échantillon entre en contact avec une source d'ADN non présente dans le milieu hydrique, ce qui fausse les résultats en créant un faux positif.

Faux négatif

L'équipement qui entre directement en contact avec l'ADNe doit être abondamment rincé à l'eau distillée après la stérilisation. En effet, si le matériel est mal rincé, il est possible que l'ADN échantillonné se dégrade en présence du produit stérilisant (p. ex., eau de Javel) et crée ainsi un faux négatif.

Méthodologie

Des protocoles d'échantillonnage d'ADNe spécifiques à certains taxons aquatiques sont en préparation, notamment pour les tortues, les salamandres, les mulottes et les poissons. Pour obtenir de l'information sur ces protocoles, contactez la DGFa de votre région.

Matériel

Tout le matériel utilisé lors de l'échantillonnage d'eau pour l'extraction d'ADNe devrait servir uniquement à ce type d'échantillonnage. Compte tenu des contraintes logistiques que cela peut imposer, certains équipements (p. ex., camion, VFI) peuvent être utilisés lors d'autres campagnes d'échantillonnage. Toutefois, il est nécessaire que les contenants des trousse d'échantillonnage pour l'ADNe soient utilisés uniquement lors des campagnes d'échantillonnage d'ADNe.

Le matériel dans les trousse d'échantillonnage doit être stérilisé et mis dans des sacs à fermeture à glissière à usage unique (p. ex., sac Ziploc^{MC}) avant le déploiement sur le terrain. Les sacs et les gants à usage unique n'ont pas besoin d'être stérilisés avant la préparation des trousse d'échantillonnage puisqu'ils doivent être neufs. La composition des trousse doit être adaptée au type de milieu et à l'emplacement de filtration (voir les sections « Milieu hydrique lentique », « Milieu hydrique lotique » et « Filtration »).

Les sacs à fermeture contenant le matériel stérilisé doivent être rangés dans des contenants neufs ou stérilisés afin d'éviter qu'ils entrent en contact avec une source de contamination lors du transport (boîte du camion, VFI, filets, etc.). Des contenants différents (sacs, bacs, etc.) doivent être utilisés pour le rangement du matériel puisque le matériel stérile ne doit pas entrer en contact avec le matériel utilisé. Les contenants peuvent même être de couleurs différentes (blanc = « stérile » et noir = « utilisé ») et un ruban adhésif peut être utilisé afin de sceller le bac stérile. Ainsi, la stérilisation est garantie uniquement si le sceau est intact à l'arrivée au site d'échantillonnage. Lorsqu'une trousse d'échantillonnage est sortie du contenant « stérile », elle ne doit pas y retourner, et ce, même si elle n'a pas été utilisée. Il faut alors la déposer dans le contenant « utilisé ».

Trousse d'échantillonnage

Filtration avec pompe

La trousse d'échantillonnage doit contenir les éléments suivants lorsqu'on effectue la filtration sur le terrain à l'aide d'une pompe (figure 1) :

- Pompe utilitaire portative;
- Paire de gants à usage unique*;
- Pince;
- Porte-filtre;
- Filtre (1,2 micron [μ])*;
- Tuyau 7/16" (extérieur) et 5/16" (intérieur);
- Tuyau 1/4" (extérieur) et 3/16" (intérieur);
- Petite enveloppe de Nitex*;
- Sachet de billes de silicate*;
- Bouteille d'échantillonnage stérilisée.



* Désigne le matériel qui doit être neuf.

Figure 1. Matériel requis pour la filtration d'un échantillon d'eau à l'aide d'une pompe

Filtration avec une seringue

Lorsqu'on effectue la filtration sur le terrain à l'aide d'une seringue, la trousse d'échantillonnage doit contenir les éléments suivants (figure 2) :

- Paire de gants à usage unique*;
- Seringue de 60 ml*;
- Tête de seringue (avec filtre* préalablement placé à l'intérieur);
- Petite enveloppe*;
- Sachet de billes de silicate*;
- Bouteille d'échantillonnage stérilisée.

* Désigne le matériel qui doit être neuf.



Figure 2. Matériel requis pour la filtration d'un échantillon d'eau à l'aide d'une seringue

Une fois stérilisé, tout le matériel, à l'exception de l'enveloppe et du sac de billes de silicate, doit être mis dans un sac à glissière à usage unique. Cette manipulation doit être réalisée dans un environnement stérile. Une fois rempli, le sac ne doit pas être ouvert avant l'échantillonnage d'eau.

Stérilisation

Le matériel réutilisable des trousse d'échantillonnage et le matériel d'usage doivent être stérilisés avant la campagne de terrain. Ainsi, le matériel doit être immergé dans une solution d'eau de Javel à 10 % (une partie d'eau de Javel dans neuf parties d'eau; p. ex., 100 ml d'eau de Javel dans 900 ml d'eau) pendant 10 minutes puis rincé à l'eau distillée (p. ex., bottes, perche). Le matériel qui est en contact direct avec l'ADNe (p. ex., porte-filtre, bouteille) doit être stérilisé avec une solution d'eau de Javel à 20 % (une partie d'eau de Javel dans quatre parties d'eau; p. ex., 200 ml d'eau de Javel dans 800 ml d'eau).

Les bottes et l'imperméable doivent être stérilisés entre chaque site d'échantillonnage et ne doivent pas être manipulés lorsque les gants servant à l'échantillonnage ont été mis. Ce matériel doit être vaporisé à l'aide d'une solution d'eau de Javel à 10 %. La solution doit agir pendant 10 minutes avant que le matériel soit rincé à l'eau potable. Si l'échantillonnage s'effectue en milieu plus éloigné, des contenants d'eau potable doivent être prévus dans le matériel de terrain.

L'embarcation (bateau, chaloupe, canot, etc.) doit également être stérilisée entre chaque site d'échantillonnage (intérieur et extérieur). Elle doit être vaporisée à l'aide d'une solution d'eau de Javel à 10 %. La solution doit agir pendant 10 minutes avant que l'embarcation soit rincée à l'eau potable. Si la campagne d'échantillonnage a lieu dans un secteur où l'accès à l'eau potable n'est pas possible, le matériel doit être rincé avec l'eau du site d'échantillonnage. La stérilisation et le rinçage s'effectuent donc juste avant l'échantillonnage, sur le site où doit avoir lieu le prélèvement d'eau.

Si l'échantillonnage s'effectue à l'aide d'une perche ou de tout autre matériel réutilisable, ceux-ci doivent également être stérilisés entre les sites d'échantillonnage.

Il n'est pas recommandé de réutiliser les bouteilles d'échantillonnage. Par contre, si cela s'avère nécessaire, une grande précaution doit être prise pour les stériliser et les rincer. Avant de réutiliser une bouteille d'échantillonnage, on doit la rincer à l'aide d'une solution d'eau de Javel à 20 % selon les étapes suivantes :

- Remplir la bouteille aux deux tiers (2/3), fermer le bouchon, laisser agir 5 minutes puis retourner la bouteille et laisser agir pendant encore 5 minutes;
- Rincer la bouteille avec de l'eau distillée à 3 reprises;
- Laisser sécher;
- Rincer la bouteille avec l'eau du site d'échantillonnage à 3 reprises. L'eau de rinçage ne doit pas être versée dans le plan d'eau.

L'équipe d'échantillonnage doit ajuster ses techniques selon le type de milieu hydrique et l'endroit de filtration en suivant les consignes décrites ci-dessous. Ces consignes sont complémentaires à celles mentionnées précédemment.

Échantillonnage

Afin de s'assurer de l'exactitude des résultats, plusieurs consignes générales doivent être respectées lors des manipulations. Ces consignes ont pour but d'éviter une contamination du matériel par l'ADN d'une source externe et la création d'un faux positif. Ainsi, l'équipe sur le terrain et celle au laboratoire doivent :

- Exercer une vigilance tout au long du processus;
- Utiliser en tout temps des gants à usage unique et favoriser l'utilisation de matériel à usage unique pour les autres équipements;
- Changer les gants entre les différentes stations d'échantillonnage;
- Éviter les manipulations inutiles lorsque les gants ont été mis;
- Ne jamais toucher l'intérieur des filtres et des bouteilles d'échantillonnage, et ce, même avec les gants;
- Bien suivre la méthode de stérilisation pour le matériel à usage multiple (p. ex., bottes) avec une solution d'eau de Javel diluée (10 %);
- Effectuer l'échantillonnage d'eau avant tout autre échantillonnage (p. ex., installation d'un filet de pêche expérimentale);
- Ne pas mettre de sédiments en suspension lors de la prise d'un échantillon d'eau.

Par la suite, la procédure adéquate doit être appliquée selon le type d'échantillonnage qui est effectué (milieu hydrique lentique ou lotique) et la méthode de filtration utilisée (pompe ou seringue).

Blanc de glacière

Une bouteille doit être remplie avec de l'eau distillée et placée dans la même glacière que les autres échantillons, et ce, au début de l'échantillonnage. Ainsi, si le résultat du blanc de glacière est contaminé, les résultats des autres échantillons de la glacière peuvent être mis en doute. Chaque glacière utilisée pour le transport des échantillons doit contenir un blanc de glacière.

Manipulations sur le terrain

Milieu hydrique lentique

Les échantillons prélevés dans un plan d'eau doivent toujours l'être en veillant à ce que l'eau à échantillonner ne soit pas en contact avec l'embarcation ou toute autre source potentielle de contamination par ADN.

Embarcation

Autant que possible, le pilote de l'embarcation doit éteindre le moteur et s'approcher du site d'échantillonnage en laissant glisser le véhicule. Cela a pour effet de diminuer les risques de mettre des sédiments en suspension avant de prendre un échantillon d'eau. Dans l'éventualité où les conditions de vent ou de vagues ne permettent pas d'éteindre le moteur, ce dernier peut être maintenu en fonction pour stabiliser la position de l'embarcation. L'utilisation d'une ancre est déconseillée puisque celle-ci risque de créer un nuage de sédiments et il ne sera plus possible de procéder à l'échantillonnage. Si des sédiments sont mis en suspension, la station d'échantillonnage devra être déplacée afin d'éviter le nuage de sédiments.

L'embarcation ne doit pas avoir circulé sur la station d'échantillonnage avant le prélèvement de l'échantillon d'eau. Ce dernier doit également être pris sur le devant de l'embarcation et, lorsque cela est possible, à l'aide d'une perche afin de s'en éloigner le plus possible. Il est aussi recommandé de maintenir le vent et les vagues de face afin de minimiser la contamination potentielle par l'embarcation.

Berge

Les membres de l'équipe d'échantillonnage ne doivent pas circuler dans le plan d'eau avant la prise d'un échantillon. S'ils doivent le faire, les bottes, ou bottes-salopettes (*waders*), doivent avoir été stérilisées selon la méthode décrite précédemment (voir la section « Stérilisation ») et toutes les précautions doivent être prises pour ne pas mettre les sédiments en suspension. Si des sédiments sont mis en suspension, l'échantillon devra être prélevé à un autre endroit situé en amont de la direction de déplacement.

Milieu hydrique lotique

Les échantillons d'eau doivent toujours être récoltés de l'aval vers l'amont dans un milieu hydrique lotique (rivière ou ruisseau), peu importe la méthode utilisée.

Embarcation

Autant que possible, le pilote de l'embarcation doit éteindre le moteur et s'approcher du site d'échantillonnage en laissant glisser le véhicule face au courant. Cela a pour effet de diminuer les risques de mettre des sédiments en suspension avant de prendre un échantillon d'eau. Si le vent et les vagues ne permettent pas d'éteindre le moteur, ce dernier peut être maintenu en fonction pour stabiliser la position de l'embarcation face au courant. L'utilisation d'une ancre est déconseillée puisque celle-ci risque de créer un panache de sédiments et il ne sera plus possible de procéder à l'échantillonnage. Si des sédiments sont mis en suspension, la station d'échantillonnage devra être déplacée vers l'amont pour s'éloigner du panache de sédiments.

L'embarcation ne doit pas avoir circulé sur la station d'échantillonnage avant le prélèvement de l'échantillon d'eau. Ce dernier doit également être pris sur le devant de l'embarcation face au courant et, lorsque cela est possible, à l'aide d'une perche afin de s'éloigner de l'embarcation. Il est aussi recommandé de conserver le vent et les vagues de face afin de minimiser la contamination potentielle par l'embarcation.

Berge

Les membres de l'équipe d'échantillonnage ne doivent pas circuler dans le cours d'eau avant la prise d'un échantillon. S'ils doivent le faire, les bottes ou *waders* doivent avoir été stérilisées selon la méthode décrite précédemment (voir la section « Stérilisation ») et toutes les précautions doivent être prises pour ne pas mettre les sédiments en suspension. Si des sédiments sont mis en suspension, l'échantillon devra être prélevé à un autre endroit situé en amont du cours d'eau.

Blanc de terrain

Un blanc de terrain doit être effectué afin de s'assurer qu'aucune contamination n'a eu lieu lors de la campagne d'échantillonnage. Généralement, un blanc de terrain est pris pour chacun des sites d'échantillonnage ou pour chacune des journées d'échantillonnage si le site requiert plus d'une journée de travail. Il doit être effectué après le dernier échantillon prélevé à un site ou à la fin de la journée, selon le cas. Il s'agit d'une bouteille d'échantillonnage qui est remplie d'eau distillée.

À noter que selon la stratégie d'échantillonnage, la technique pour effectuer un blanc de terrain peut varier. Il est recommandé de consulter le chargé de projet ou un spécialiste de l'ADNe afin de la valider.

Filtration

Le matériel utilisé dans le cadre d'une campagne d'échantillonnage varie selon la méthode employée et l'endroit où s'effectue la filtration. La filtration peut avoir lieu sur le terrain ou en laboratoire à l'aide d'une pompe ou d'une seringue. La méthode permettant de s'assurer que le matériel est stérile et le demeure est décrite dans les sections suivantes.

Laboratoire

La filtration en laboratoire est à favoriser lorsque cela est possible. Cette méthode de travail permet de minimiser la contamination si les consignes suivantes sont respectées :

- Chaque bouteille d'échantillonnage vide doit être mise dans un sac à glissière à usage unique. Une fois l'échantillon d'eau prélevé sur le terrain, la bouteille est remise dans le sac et un identifiant unique est inscrit sur celui-ci.
- Les échantillons prélevés sont placés dans une glacière avec des blocs réfrigérants (Ice packs^{MC}). La glacière et les blocs réfrigérants utilisés sont destinés seulement aux projets d'ADNe et doivent être stérilisés entre les campagnes d'échantillonnage. Ainsi, la glacière et les blocs réfrigérants doivent être vaporisés avec une solution d'eau de Javel à 10 %. La solution doit agir pendant 10 minutes avant le rinçage du matériel à l'eau potable.
- Pour chacune des glacières utilisées pour le transport des échantillons, on doit préparer et y déposer un « blanc de glacière ».
- Il faut préparer un ou des « blancs de terrain », selon l'envergure de la campagne d'échantillonnage.

Lors de la filtration, l'espace de travail doit être stérilisé entre chaque station d'échantillonnage et des « blancs de laboratoire » doivent être effectués. Une attention particulière doit être portée aux produits de réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) ou aux autres produits d'extraction lorsque les échantillons sont filtrés au laboratoire. Il est recommandé de choisir un endroit où aucune extraction d'ADN et/ou de PCR n'est effectuée afin de limiter la contamination des échantillons. La filtration doit se faire sur un plan de travail préalablement désinfecté. La désinfection de celui-ci est réalisée avec une solution d'eau de Javel à 10 % et elle doit agir pendant 10 minutes puis le plan de travail est recouvert de papier.

Cas particuliers

Plusieurs cas particuliers (p. ex., échantillonnage en hiver, échantillonnage en profondeur) peuvent être rencontrés lors de campagnes d'échantillonnage d'eau et ils nécessitent des stratégies et du matériel spécifiques. Il est donc recommandé de valider les méthodes d'échantillonnage utilisées avec le chargé de projet ou un spécialiste de l'ADNe.

Le protocole de filtration peut également être adapté lorsque les stations d'échantillonnage sont situées dans un milieu hydrique turbide. Encore ici, il est recommandé de discuter avec le chargé de projet ou un spécialiste de l'ADNe.

Prévention de la propagation des maladies et des espèces exotiques envahissantes

Il est fortement recommandé d'adopter une approche de biosécurité pouvant permettre de réduire les risques de propagation de maladies ou d'espèces exotiques envahissantes (EEE).

Élimination des organismes

Tout le matériel ayant été en contact avec l'eau (bottes, bottes-salopettes, épuisettes, nasses, seaux, etc.) peut être un vecteur de transmission d'agents infectieux ou d'EEE. Il est donc recommandé de nettoyer à la brosse et de rincer l'ensemble du matériel utilisé afin d'enlever la terre, la vase, les algues, les plantes aquatiques et tous les petits organismes qui pourraient être collés à l'équipement (Dejean et coll., 2007; Groupe de travail canadien sur la santé de l'herpétofaune [GTCSH], 2017). Selon le GTCSH, il est recommandé d'effectuer le lavage avant de quitter le site d'échantillonnage ou de le faire sur une surface imperméable.

Les méthodes de décontamination sont décrites au tableau 1. Il est également possible de faire sécher le matériel pour détruire les organismes, bien que le temps de traitement requis soit beaucoup plus long. Le séchage ne détruit pas l'ADN, il élimine uniquement les maladies ou les EEE. Afin d'éliminer ces dernières, il est nécessaire de prévoir un temps de séchage minimal de 5 jours consécutifs. Les conditions météorologiques pendant ces 5 jours doivent être propices au séchage, soit une absence de pluie et un taux d'humidité inférieur à 65 % (tableau 1). Si jamais la météo est défavorable (pluie ou taux d'humidité atmosphérique trop élevé), le temps de séchage devra être prolongé. Avant la période de séchage, toute eau stagnante doit être drainée de l'embarcation et de l'équipement.

Tableau 1. Méthodes de décontamination proposées

| Méthode | Température ou concentration | Pression | Temps de traitement par surface pour déloger les organismes |
|---|------------------------------|---------------|---|
| Nettoyage | Vapeur > 60 °C | 2 600 psi | 5 – 10 secondes |
| Eau chaude | 60 °C | Sans pression | 10 minutes |
| | 60 °C | 2 600 psi | 5 – 10 secondes |
| Chlore ou eau de Javel (non concentré) | 100 ml/L | - | 10 minutes |
| Vinaigre blanc | 750 ml/L | - | 20 minutes |
| Séchage à l'air | Humidité de < 65 % | - | 5 jours consécutifs |
| Congélation | Entre -9 et 0 °C | - | 24 heures |
| | -9 °C et moins | - | 8 heures |

Source : MFFP (2018).

Désinfection du matériel

L'objectif de la désinfection est d'éliminer du matériel toute trace de pathogènes qui pourrait être transportée vers un autre milieu hydrique. Ainsi, tout le matériel doit être désinfecté sur place après la prise d'échantillons. Il est préférable de choisir un chemin, une route ou une surface compacte et imperméable suffisamment éloignée du milieu aquatique pour limiter les écoulements de la solution de désinfection dans le milieu naturel.

Plusieurs désinfectants chimiques ont été évalués pour leur efficacité, disponibilité, facilité d'usage et de rejet en milieu naturel après utilisation (Dejean et coll., 2007). L'eau de Javel est un désinfectant efficace, mais elle comporte certains risques pour les utilisateurs, les amphibiens et le milieu aquatique. Toutefois, le GTCSH (2017) mentionne que l'eau de Javel se dégrade relativement vite et présente un risque plus faible pour l'environnement que d'autres désinfectants. Selon ce groupe, une immersion dans une solution d'eau de Javel, diluée pour obtenir une solution à 5 % (une partie d'eau de Javel dans 19 parties d'eau; p. ex., 50 ml d'eau de Javel dans 950 ml d'eau), est suffisante pour neutraliser la maladie du chytride (*Batrachochytrium dendrobatidis*), les ranavirus et la maladie fongique du serpent, causée par le champignon *Ophidiomyces ophiodiicola* (GTCSH, 2017). L'eau de Javel doit être appliquée et doit agir pendant au moins 15 minutes. Son utilisation doit se faire aussi éloignée que possible du milieu aquatique (Dejean et coll., 2007; GTCSH, 2017).

Matériel

Le matériel suivant est requis pour bien décontaminer les éléments utilisés lors d'un inventaire en milieu aquatique (GTCSH, 2017; figure 3) :

- Agent de blanchiment domestique commercial (p. ex., eau de Javel Clorox®);
- Grand bac ou sac pouvant contenir environ 25 L d'eau (p. ex., bac Rubbermaid®);
- Seau ou contenant doté d'un couvercle étanche;
- Contenant d'eau potable;
- Flacons pulvérisateurs;
- Brosses à récurer;
- Gants à usage unique;
- Lunettes de sécurité.



Source : GTCSH (2017).

Figure 3. Matériel de décontamination

Véhicules et embarcations

Les véhicules terrestres (camionnettes, VUS, VTT) ne semblent pas être des vecteurs de transmission reconnus d'agents infectieux. Cependant, un nettoyage régulier est une précaution recommandée. La désinfection après l'usage de l'équipement utilisé et son rangement dans des bacs (eux-mêmes régulièrement désinfectés) dans le véhicule permet de limiter les risques de contamination croisée secondaire.

Les VTT qui ont été en contact avec le milieu hydrique, ainsi que toutes les embarcations et le matériel entrés en contact avec l'eau (remorques, ancre, rames, etc.), devraient faire l'objet d'une désinfection (lavage à l'eau puis, en fonction de leur taille, trempage, lessivage ou pulvérisation d'une solution de désinfection) puis d'un séchage à l'air libre (Dejean et coll., 2007; MFFP, 2018). Une visite au lave-auto est une autre option préconisée. Pour les embarcations, l'utilisation d'une station de lavage de bateaux avec un boyau à pression est un excellent moyen de déloger les résidus qui pourraient contaminer d'autres plans d'eau.

Références

- BRITISH COLUMBIA MINISTRY OF ENVIRONMENT (2017). *Environmental DNA protocol for freshwater aquatic ecosystems, Version 2.2*. Ecosystems Branch, 32 p. + annexes.
- CARIM, K. J., K. S. MCKELVEY, M. K. YOUNG, T. M. WILCOX et M. K. SCHWARTZ (2016). *A protocol for collecting environmental DNA samples from streams*. General Technical Report RMRS-GTR-355, US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fort Collins, Colorado, 18 p.
- DEJEAN, T., C. MIAUD et M. OUELLET (2007). « Proposition d'un protocole d'hygiène pour réduire les risques de dissémination d'agents infectieux et parasitaires chez les amphibiens lors d'intervention sur le terrain », *Bulletin de la Société Herpétologique de France*, **122** : 40-48.
- GTCSH (2017). *Protocole de décontamination pour le travail sur le terrain avec les amphibiens et les reptiles au Canada*, 8 p. + annexe.
- LARAMIE, M. B., D. S. PILLIOD, C. S. GOLDBERG et K. M. STRICKLER (2015). *Environmental DNA sampling protocol – Filtering water to capture DNA from aquatic organisms*, US Geological Survey Techniques and Methods, book 2, chapter A13, 15 p.
- MFFP (2018). *Guide des bonnes pratiques en milieu aquatique dans le but de prévenir l'introduction et la propagation d'espèces aquatiques envahissantes*, Gouvernement du Québec, 32 p.
- US FISH AND WILDLIFE SERVICE (2019). *Quality assurance project plan: eDNA monitoring of bighead and silver carps*, United States of America, 161 p.



**Forêts, Faune
et Parcs**

Québec 