



T R E A M

Sequencing the River for Environmental Assessment and Monitoring

**Procédure pour le prélèvement
d'échantillons d'ADN de
macroinvertébrés benthiques dans
les cours d'eau accessibles à gué**

Mars 2020



Remerciements

Cette procédure est une adaptation des travaux antérieurs réalisés par Michael Wright, Chloe Robinson et Mehrdad Hajibabaei du laboratoire Hajibabaei (Université de Guelph), Kristie Heard, Colin Curry, Alex Bush et Donald Baird du laboratoire Baird (Canadian Rivers Institute, Université du Nouveau-Brunswick) et Nellie Gagne, Mélanie Roy et Royce Steeves du laboratoire Gagné.

Nous remercions tout particulièrement les personnes suivantes d'Environnement et Changement climatique Canada pour leur contribution à l'application, à l'examen de cette procédure et à leurs commentaires sur ce sujet : Sheena Pappas, Adam Martens, Alain Armellin, Alex Bush, Donald Baird, Emma Garden, Édith Lacroix, Lauren Pothier, Stephanie Strachan, Wendy Monk et Caroline Robert.

Objectif

Décrire une procédure préliminaire pour le prélèvement d'échantillons d'ADN de macroinvertébrés benthiques à la suite de la publication du [Manuel de terrain Cours d'eau accessibles à gué du RCBA](#), incluant plusieurs modifications qui visent à réduire au minimum la contamination de l'ADN et faire en sorte que le matériel génétique dans un échantillon soit adéquatement préservé.

Les modifications du prélèvement d'échantillons morphologiques du RCBA par rapport au prélèvement d'échantillons d'ADN sont les suivantes:

- Des gants en nitrile sont portés pendant l'échantillonnage et le traitement des échantillons. Le port d'une nouvelle paire de gants est obligatoire pour chaque nouvel échantillon d'ADN prélevé;
- L'équipement d'échantillonnage et de traitement des échantillons est décontaminé avant le prélèvement de chaque échantillon d'ADN;
- Des bocaux neufs ou décontaminés sont utilisés pour conserver le matériel biologique et sont maintenus scellés jusqu'au transfert de l'échantillon;
- Les échantillons sont transvasés dans le récipient à échantillon au moyen d'éthanol dénaturé;
- Les échantillons d'ADN sont conservés dans de l'éthanol dénaturé et gardés au froid après le prélèvement même et avant leur transfert vers une installation de séquençage.

Les échantillonneurs doivent connaître et respecter toutes les exigences du Système d'information sur les matières dangereuses utilisées au travail (SIMDUT 2015), du Transport des marchandises dangereuses (TMD) et d'autres considérations, exigences ou règlements en matière de santé et de sécurité lorsqu'ils utilisent ou transportent de l'eau de Javel, de l'éthanol dénaturé, des échantillons contenant de l'éthanol dénaturé et des eaux de rinçage usées.

Équipement et matériel d'échantillonnage nécessaire

En sus de la trousse d'échantillonnage sur le terrain standard du RCBA pour la biosurveillance aquatique (<https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/reseau-canadien-biosurveillance-aquatique/ressources/trousse-echantillonnage-terrain-standard.html>), l'équipement et le matériel suivants sont nécessaires pour l'échantillonnage de l'ADN:

1. Eau de Javel non parfumée
2. Solution d'eau de Javel préparée* (voir la préparation ci-dessous)
3. Flacon brumisateur d'eau de Javel (solution d'eau de Javel)* (voir la préparation ci-dessous)
4. Lunettes de sécurité (avec écran latéral)
5. Brosse de nettoyage
6. Gants en nitrile
7. Gants en caoutchouc épais (pour la décontamination à l'eau de Javel)
8. Éthanol dénaturé (95 %)*
9. Flacon laveur (éthanol dénaturé)*
10. Ruban isolant ou Parafilm®¹
11. Plateau ou seau de collecte des eaux usées (pouvant être scellé)
12. Glacière pour les récipients à échantillons* (étiquetée conformément aux exigences relatives au TMD)*
13. Glacière pour l'éthanol dénaturé (étiquetée conformément aux exigences du TMD)*

*Remarque : l'étiquetage est conforme aux exigences du Système d'information sur les matières dangereuses utilisées au travail (SIMDUT) et du transport des marchandises dangereuses (TMD) et veille à ce que les fiches signalétiques (FS) soient faciles à consulter.

Matériel pour le prélèvement d'échantillons de macroinvertébrés benthiques

- Trousse d'échantillonnage standard du RCBA (consulter le [Manuel de terrain Cours d'eau accessibles à gué du RCBA](#)),
- Éthanol dénaturé*
- Flacon laveur pour l'éthanol
- Gants en nitrile (plusieurs)
- Lunettes de sécurité (lors de l'utilisation d'éthanol)
- Ruban isolant ou Parafilm®

Matériel de décontamination

- Eau de Javel non parfumée*
- Solution d'eau de Javel préparée* (voir la préparation ci-dessous)
- Flacon brumisateur pour la solution d'eau de Javel*
- Flacon pulvérisateur pour l'eau de rinçage
- Brosse de nettoyage
- Gants en caoutchouc épais
- Grand seau pour la collecte
- Lunettes de sécurité

¹ Parafilm® (Beamis, 2020. Oshkosh, WI, États-Unis).

L'éthanol dénaturé est un produit chimique utilisé pour la conservation des échantillons d'ADN.

L'éthanol dénaturé contient des ingrédients supplémentaires (ou dénaturants) qui sont ajoutés à l'éthanol pour le rendre impropre à la consommation

Pour connaître les propriétés et les précautions d'utilisation de l'éthanol dénaturé, consultez la Fiche signalétique (FS).

L'eau de Javel est un produit chimique utilisé pour décontaminer le matériel d'échantillonnage d'ADN.

Pour connaître les propriétés et les précautions d'utilisation de l'eau de Javel, consultez la FS.

Considérations relatives au prélèvement d'échantillons d'ADN

En cas de prélèvement d'échantillons aux fins d'identification morphologique et de l'ADN, les options d'échantillonnage pour différents scénarios de site sont décrites ci-après:

a) *Plusieurs bancs portant des échantillons convenables ou grand banc à échantillons dans le tronçon d'échantillonnage¹*

1 échantillon d'ADN, 1 échantillon morphologique et 1 prélèvement par filet troubleau : prélever l'échantillon d'ADN d'abord en aval, ce qui élimine le besoin de décontaminer entre les prélèvements par filet troubleau.

b) *Un banc isolé dans le tronçon d'échantillonnage¹*

1 échantillon d'ADN, échantillon morphologique et 2 prélèvements par filet troubleau : le prélèvement peut se faire simultanément par deux personnes au moyen de troubleaux. Utiliser deux filets et commencer aux extrémités opposées du même banc (en avançant en zigzag sur le banc en direction du centre) (figure X). Les personnes utilisant les troubleaux doivent éviter de se trouver dans la « zone de perturbation » de l'une et de l'autre.

S'il faut prélever des échantillons d'ADN à un seul endroit, il faut décontaminer tout le matériel de prélèvement et de traitement entre les prélèvements d'ADN en suivant la procédure ci-après. Parmi les options permettant de rendre le prélèvement et le traitement d'échantillons plus efficaces et de réduire au minimum la contamination figure l'utilisation de filets décontaminés et d'équipement de traitement des échantillons distincts.

¹tronçon d'échantillonnage s'entend de six fois la largeur à pleins bords

Décontamination de l'équipement et prélèvement d'échantillons

Préparation d'une solution d'eau de Javel

1. Préparez une solution d'eau de Javel diluée en proportion de 1 pour 10 en mélangeant une partie d'eau de Javel non parfumée (concentration minimale de 5,25 %) avec neuf parties d'eau dans un flacon brumisateurs étiqueté, ce qui aboutit à une concentration finale d'hypochlorite de sodium d'au moins 0,525 %.

Décontamination de l'équipement d'échantillonnage et de traitement des échantillons

2. Sur le site et à l'extérieur de la zone riveraine, inspectez l'équipement d'échantillonnage pour vérifier qu'il ne contient pas de débris organiques. Nettoyez-le au besoin.
3. Lorsque vous portez des gants de caoutchouc décontaminés et que vous vous tenez au-dessus d'un seau ou d'un plateau de prélèvement, utilisez un flacon brumisateur pour vaporiser une solution d'eau de Javel diluée de manière à en recouvrir toute la surface du matériel d'échantillonnage et de traitement des échantillons, y compris les cuissardes, les bottes, les filets troubleaux, les tamis, le seau à tourbillon, les pinces, le flacon laveur et tout autre matériel utilisé pour recueillir ou traiter les échantillons benthiques inclus les bocaux à échantillon. Laissez reposer de deux à cinq minutes.
4. Rincez à fond tout le matériel traité à l'eau de Javel avec de l'eau² dans le seau. L'eau de rinçage doit être recueillie et éliminée dans un débit d'eau municipal conformément aux précautions ou aux règlements requis.

² Remarque : Il est préférable d'avoir de l'eau potable propre, mais ce n'est probablement pas possible sur le terrain. De l'eau claire provenant du cours d'eau peut être utilisée dans des flacons pulvérisateurs.

Prélèvement et traitement des échantillons

5. Enfilez deux nouvelles paires de gants en nitrile et procédez au prélèvement et au traitement de l'échantillon par seau à tourbillon, conformément au [Manuel de terrain Cours d'eau accessibles à gué de 2012 du RCBA](#). Une fois que le prélèvement de l'échantillon en cours d'eau est achevé et que vous êtes prêt à entreprendre le traitement de l'échantillon, enlevez une paire de gants en nitrile. Il convient de noter les étapes ou les exceptions supplémentaires suivantes :

Il faut porter une paire de gants neufs en nitrile pour chaque nouvel échantillon d'ADN. Il faut toujours porter des gants pour manipuler des échantillons.

- a) Lors du transvasement d'un échantillon d'invertébrés dans un récipient à échantillon décontaminé,
 - Lorsque la végétation est minimale, rincer et inspecter les feuilles et autres végétaux provenant du tamis avec l'eau du cours d'eau du flacon laveur, au-dessus du tamis.
- OU
- En présence de grandes quantités de plantes aquatiques (p. ex., Myriophyllum ou cornifle nageante) qui peuvent piéger les invertébrés pendant le tourbillon du seau, il faut rincer le matériel végétal en le faisant tremper dans un seau d'eau claire du cours d'eau. L'eau de rinçage est filtrée à travers le tamis lorsque le rinçage est terminé.

Jetez les matières végétales afin de réduire le plus possible la quantité de matière organique dans le récipient à échantillon. Conservez les tiges en décomposition si

Procédure EN COURS D'EAU pour le prélèvement d'échantillons d'ADN de macroinvertébrés benthiques dans les cours d'eau accessibles à gué

elles semblent abriter des invertébrés. Continuez de faire tourbillonner les pierres et les sédiments dans le seau.

- b) Rincez et retirez les pierres et les petits cailloux du tamis, car ils endommageront l'équipement pendant l'homogénéisation de l'échantillon. Une petite quantité de sable est souhaitable pour faciliter le mélange (p. ex., 1 à 2 cm au fond du récipient à échantillon).
- c) Si un récipient à échantillon est plus qu'à moitié plein, il est préférable d'en répartir le contenu dans deux bocaux ou plus. Ceci est important pour faire en sorte que la **concentration finale d'éthanol dénaturé soit de 50 % ou plus** dans l'échantillon aux fins d'entreposage.
- d) Utilisez le flacon laveur d'éthanol dénaturé pour rincer le restant d'échantillon du tamis et le transférer dans le ou les bocaux à échantillon.

L'éthanol dénaturé est utilisé pour la conservation des échantillons.

Les bocaux à échantillon décontaminés doivent rester ouverts jusqu'à ce que vous en ayez besoin.

- e) Ajoutez de l'éthanol dénaturé supplémentaire au récipient à échantillon pour garantir la conservation de l'échantillon; **la concentration finale d'éthanol dénaturé est de 50 % ou plus.**
 - f) Collez une étiquette sur le couvercle et le côté du récipient à échantillon de façon appropriée (p. ex., un crayon gras peut être utilisé puisque l'étiquette ne sera pas dissoute par l'éthanol). **Il ne faut PAS placer une étiquette de code de site à l'intérieur du récipient afin de réduire le risque de contamination de l'ADN.**
 - g) Pour empêcher les fuites et la contamination croisée pendant le transport, utilisez du ruban isolant ou du Parafilm® de façon à sceller la paroi extérieure du récipient. Le ruban isolant ou le Parafilm® devront être tendus de façon à assurer l'étanchéité.
6. Il faut placer les échantillons immédiatement sur de la glace dans une glacière ou dans un congélateur portatif. Les échantillons doivent être placés dans un congélateur jusqu'à ce qu'ils soient envoyés à une installation de séquençage.

Toute expédition d'éthanol dénaturé ou de tout échantillon renfermant de l'éthanol dénaturé doit respecter les exigences du Règlement sur le transport des marchandises dangereuses (TMD).

- 7. Répétez la décontamination de l'équipement d'échantillonnage et de traitement avant le prélèvement du prochain échantillon d'ADN.