

# METHODOLOGIE ADNe AMPHIBIENS PRELEVEMENTS SUR LE TERRAIN



ÉTAT : JANVIER 2019

# Sommaire

1. Bureaux accrédités 2019 .....	2
2. Contacts .....	2
3. Introduction .....	3
4. Remarques importantes et recommandations .....	3
5. Relevés ADNe 2019 .....	4
6. Liste de matériel.....	5
7. Manipulations .....	6
8. Prélèvement d'échantillons .....	7
9. Exemple pratique .....	9
10. Glossaire.....	10
11. Offre et prix courants .....	11
12. Commandes .....	12

**Proposition de citation** : ARNAL et al. (État : Janvier 2019). Méthodologie ADNe amphibiens - prélèvements sur le terrain.

## 1. Bureaux accrédités 2019

ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG	Herisau, Salzbourg
IC Infraconsult AG	Berne
Info fauna - karch	Neuchâtel
Kaden & Partner AG	Frauenfeld
Naturschutz und Feldherpetologie Peyer	Ottenbach
Quadra GmbH	Zurich
UMG Umweltbüro Grabher	Bregenz (A)

## 2. Contacts

Informations générales et commande de matériel de prélèvement :

Envoi des échantillons pour les analyses de laboratoire :

ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG Kasernenstrasse 37 9100 Herisau assistenz@arnal.ch (objet: ADNe) 071 366 00 50	Ecogenics GmbH Jeannette Kast   eDNA Schützenstrasse 15 9436 Balgach info@ecogenics.ch
--	--

### 3. Introduction

Ces dernières années, de nouvelles techniques de laboratoire ont révolutionné l'analyse génétique des végétaux et des animaux. Grâce aux énormes projets réalisés, la génétique peut maintenant être utilisée dans de nouveaux domaines d'application pratique. L'ADN environnemental (ADNe) permet par exemple de déterminer quels amphibiens peuplent un plan d'eau. Dans le cadre du projet CTI « Génétique de la conservation », des marqueurs ont été définis pour toutes les espèces d'amphibiens indigènes. Une méthodologie de relevé a également été développée et testée entre 2016 et 2017 dans quelque 80 plans d'eau de différents cantons de Suisse alémanique. Pour plus d'informations sur le projet CTI, nous vous renvoyons au site [www.naturschutzgenetik.ch](http://www.naturschutzgenetik.ch).

En plus des connaissances acquises dans le cadre du projet CTI en cours, il est maintenant prévu d'utiliser cette méthode à plus large échelle et d'intégrer annuellement les résultats obtenus dans la méthodologie, afin de l'optimiser continuellement. Les retours des utilisateurs sur les problèmes rencontrés ainsi que les propositions d'amélioration sont donc les bienvenus.

La présente méthodologie « Prélèvements sur le terrain ADNe Amphibiens » a été complétée par une méthodologie « Analyse des données ADNe Amphibiens », qui décrit comment les résultats de laboratoire doivent être analysés et interprétés.

Le glossaire en page 10 explicite les principaux termes utilisés dans le présent document.

### 4. Remarques importantes et recommandations

À l'instar des autres méthodes de recensement, le relevé par ADNe ne peut garantir que toutes les espèces d'amphibiens présentes dans une aire définie seront effectivement recensées. Si le taux d'erreurs des analyses est comparativement bas, le taux d'erreurs lors du prélèvement des échantillons sur le terrain peut être élevé, suivant les espèces. D'une part, parce que toutes les espèces ne sont pas présentes simultanément dans le plan d'eau (ponte précoce ou tardive) et, d'autre part, parce que la durée de séjour dans l'eau est variable d'une espèce à l'autre (p. ex. le crapaud accoucheur vit principalement sur la terre ferme). Pour obtenir une image aussi complète que possible des espèces d'amphibiens qui peuplent une aire donnée, il convient donc d'inclure tous les plans d'eau (voir chapitre 8 et glossaire) qui s'y trouvent dans l'étude (p. ex. sonneur à ventre jaune dans les petits plans d'eau voisins).

Afin de réduire le plus possible le taux d'erreurs lors du prélèvement des échantillons, il est recommandé de définir la fenêtre temporelle et les sites de prélèvement avec un spécialiste, comme pour les relevés de terrain « classiques ». Le déroulement des opérations est décrit au chapitre « Prélèvement des échantillons ». Il est extrêmement important de connaître la problématique exacte à laquelle doit répondre le recensement avant de procéder au relevé par

ADNe, car la sélection des plans d'eau à échantillonner, le nombre de visites à effectuer et le nombre d'échantillons de laboratoire à fournir en dépendent. Il est donc nécessaire de consulter un spécialiste reconnu disposant de connaissances sur les amphibiens.

Le karch - info fauna accepte les résultats des relevés par ADNe et alimente sa banque de données avec les résultats obtenus. Il est recommandé de procéder à des relevés de terrain par ADNe en complément à des relevés de terrain « classiques ». La méthode ADNe permettra ainsi d'acquérir des informations supplémentaires, en particulier sur les espèces qui vivent cachées ou qui sont difficiles à identifier.

## 5. Relevés ADNe 2019

La présente méthodologie (voir chapitres 6 à 9) présente le déroulement des opérations, le matériel requis, la manipulation des échantillons (y c. préparation et nettoyage/désinfection) ainsi que les différentes analyses possibles.



Figure 1 : Flux de matériel et d'informations pour la réalisation d'un relevé par ADNe

La détermination de la quantité de matériel nécessaire est présentée au chapitre 9. Tout le matériel d'usage peut être commandé auprès d'ARNAL AG avec le formulaire annexé. Nous préparons le matériel dont vous avez besoin (y c. réserve) pour votre mission.

La date de référence pour l'envoi des échantillons de laboratoire à ecogenics GmbH pour l'analyse collective<sup>1</sup> est le 31 juillet 2019. Les données seront livrées cinq semaines plus tard. L'envoi des échantillons de projet<sup>2</sup> peut se faire à n'importe quelle date.

<sup>1</sup> Voir glossaire. Échantillon collectif : Échantillons envoyés au laboratoire qui doivent être analysés pour une date fixe avec tous les autres échantillons de laboratoire envoyés. Le coût par échantillon est fixe.

<sup>2</sup> Voir glossaire. Échantillons de projet : Échantillons envoyés au laboratoire qui doivent être analysés jusqu'à la date fixée par le client. Le coût des échantillons diminue avec le nombre d'échantillons envoyés.

## 6. Liste de matériel

### Prélèvement d'échantillons

« Kit ADNe ARNAL »

		Nombre
<input type="checkbox"/>	Gants en plastique	1 paire par site (+ 1 paire de réserve)
<input type="checkbox"/>	Tube de prélèvement / éprouvettes (50 ml)	Selon le plan d'échantillonnage
<input type="checkbox"/>	Bouteille PET (0,5 à 1 l)	Min. 1 par site
<input type="checkbox"/>	Tampon standard = 33,5 ml éthanol (pur, Honeywell) + 1,5 ml acétate de sodium (3M, pH 5,2)	0,35 ml par éprouvette
<input type="checkbox"/>	Éprouvettes avec tampon de réserve	1 à 2 par site
<input type="checkbox"/>	Râteliers	Selon le nombre d'éprouvettes
<input type="checkbox"/>	Codes QR préimprimés à coller sur les éprouvettes	1 par échantillon/éprouvette
<input type="checkbox"/>	Sampling Submission Form (SSF)	1 par site
<input type="checkbox"/>	Outil de prélèvement d'échantillons*	1

\* Peut être commandé en sus

### Matériel supplémentaire (à se procurer soi-même)

<input type="checkbox"/>	Glacière avec éléments réfrigérants	1
<input type="checkbox"/>	Appareil photographique	1
<input type="checkbox"/>	Ruban adhésif transparent	1
<input type="checkbox"/>	Matériel d'écriture / feutre indélébile	1

### Nettoyage et désinfection sur le terrain

<input type="checkbox"/>	Spray à l'alcool (70 %) ou Virkon (fabricant : Antec International)	1
<input type="checkbox"/>	Serviettes en papier	5 par site
<input type="checkbox"/>	Eau du robinet pour nettoyer l'outil de prélèvement	1 l par site

### En sus pour les grands sites

<input type="checkbox"/>	Bidon de 5 l	1
<input type="checkbox"/>	Sacs en plastique pour recouvrir le bidon	1 par site



Tube de prélèvement (50 ml) fixé sur l'outil de prélèvement



Râtelier à éprouvettes avec code QR collé

## 7. Manipulations

### Préparation

- Préparer le Sampling Submission Form (SSF) et év. le rapport de terrain.
- Remplir les codes QR et les coller sur les éprouvettes contenant le tampon à l'aide du ruban adhésif.

### Prélèvement d'échantillons

- Enfiler les gants en plastique.
- Fixer le tube ouvert sur l'outil de prélèvement.
- Plonger le tube dans l'étang sur les sites de prélèvement définis par le spécialiste, à une distance d'environ 1 m de la rive et à une profondeur d'environ 10 cm et le remplir complètement d'eau.
- Transvaser l'échantillon d'eau (50 ml d'eau de l'étang) dans la bouteille PET.
- Refermer la bouteille PET contenant les échantillons d'eau et la secouer énergiquement.
- Verser 15 ml de ce mélange dans les éprouvettes contenant le tampon et identifiées par un code QR (= échantillon de laboratoire).
- Conserver le râtelier à éprouvettes et les éprouvettes dans la glacière.
- Compléter le Sampling Submission Form (SSF) et év. le rapport de terrain.
- Au besoin, signaler les sites de prélèvement sur la carte ou sur une orthophotographie.
- Si nécessaire, documenter le site avec une photo.

### Désinfection et nettoyage (à effectuer à la fin du travail sur chaque site)

- Laver l'outil de prélèvement avec de l'eau du robinet, puis l'essuyer avec des serviettes en papier pour éliminer d'éventuelles traces d'ADN.
- Désinfecter ensuite le manche et l'outil avec la solution alcoolique ou le Virkon afin d'éviter la propagation éventuelle du chytride (*Batrachochytrium dendrobatidis*) ou d'autres vecteurs de maladies.

### Stockage/expédition

- Stocker les éprouvettes pleines dans la glacière pendant le travail sur le terrain.
- Expédier/apporter les échantillons de laboratoire au laboratoire dans un délai d'un jour (non réfrigérés) ou
- Stocker à plus long terme (plusieurs jours) au congélateur (-20° C).
- Imprimer le Sampling Submission Form et le joindre aux échantillons de laboratoire ; l'envoyer également par courriel à [info@ecogenics.ch](mailto:info@ecogenics.ch).

### Important

- Il est recommandé d'effectuer tous les travaux sur le terrain avec des gants afin de réduire le plus possible une contamination des échantillons par de l'ADN humain.
- Tout le matériel jetable (éprouvettes, bouteilles PET, gants, sacs plastique) doit être éliminé à la fin du travail sur chaque site.
- Le nettoyage de l'outil de prélèvement avec de l'eau (contre la contamination par de l'ADN du site précédent) et sa désinfection (contre la propagation du chytride) doivent être effectués soigneusement à la fin du travail sur chaque site.

## 8. Prélèvement d'échantillons

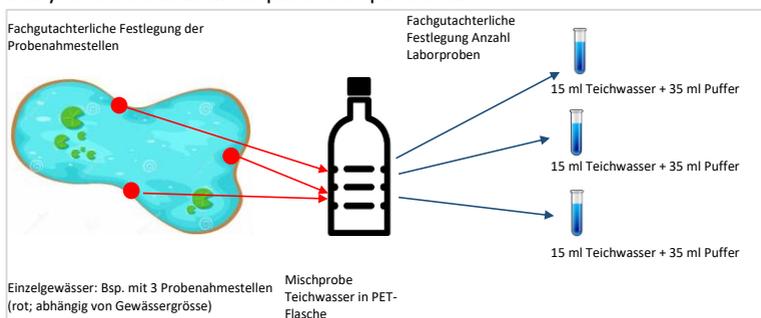
### Plan unique

Dans le cas d'un plan unique, on prélèvera des échantillons d'eau en plusieurs endroits. Le nombre de sites de prélèvement doit être déterminé sur place (ou préalablement à l'aide d'une vue aérienne) par un spécialiste. Valeurs indicatives selon la surface du plan d'eau :

- < 50 m<sup>2</sup> = 3 à 5 sites de prélèvement
- 50-500 m<sup>2</sup> = 6 à 10 sites de prélèvement
- > 500 m<sup>2</sup> = 11 à 20 sites de prélèvement

L'emplacement exact des sites de prélèvement doit être déterminé sur le terrain par un spécialiste, car il s'agit d'échantillonner les zones du rivage ou du plan d'eau qui sont vraiment susceptibles de servir d'habitat aux amphibiens (en tenant compte des habitats différents des urodèles et des anoures).

Tous les échantillons d'eau de 50 ml sont mélangés dans une bouteille PET refroidie, puis on remplit le nombre d'éprouvettes souhaité avec 15 ml d'eau de l'étang et 35 ml de tampon. Le nombre d'éprouvettes (= échantillons de laboratoire) envoyé au laboratoire dépend de la problématique et doit être déterminé à l'avance par un spécialiste. On recommande en principe de faire analyser trois échantillons par site et par visite.



La période de prélèvement des échantillons dépend aussi de la problématique. En revanche, l'heure du jour et la météo ne jouent aucun rôle. Pour recueillir des données sur les espèces à ponte précoce et à ponte tardive, il est recommandé d'effectuer deux visites. Si l'on veut seulement savoir si un plan d'eau sert d'habitat aux amphibiens<sup>3</sup> ou recueillir des données sur une seule espèce<sup>4</sup>, une seule visite peut suffire. Valeurs indicatives selon la nature des données recherchées :

- Présence générale d'amphibiens 1 visite avec prélèvement (3 échantillons) : début mai<sup>1, 2</sup>.
- Présence de certaines espèces 2 visite avec prélèvement (3 échantillons chaque fois) : première moitié d'avril (ponte précoce) et mi-mai (ponte tardive).

<sup>3</sup> Peuplement d'amphibiens : oui ou non ? ; plus grande probabilité pour la présence d'amphibiens en général : début mai.

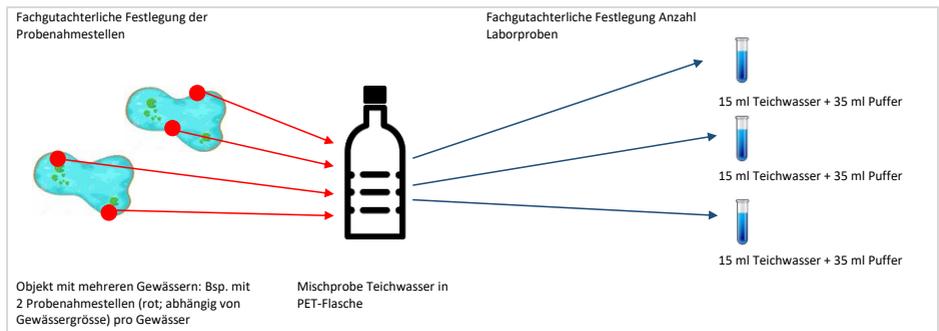
<sup>4</sup> Période du relevé en fonction de la période de vie aquatique de l'espèce visée.

## Plan complexe

Les sites de prélèvement, le nombre d'échantillons d'eau de laboratoire ainsi que le nombre de visites se déterminent comme pour un plan unique. Pour un plan complexe, on peut recueillir soit des échantillons de laboratoire pour chaque plan d'eau soit un échantillon de laboratoire pour l'ensemble des plans d'eau. Dans le premier cas, on procède pour chaque plan d'eau comme s'il s'agissait d'un site. Entre chaque échantillonnage, il faut donc éliminer tout le matériel jetable et nettoyer l'outil de prélèvement.

Si le plan complexe est traité comme un tout, les échantillons d'eau des différents plans d'eau sont recueillis sur les différents sites de prélèvement définis par le spécialiste, puis ils sont tous mélangés dans une bouteille PET avant d'être transvasés dans les éprouvettes pour l'analyse en laboratoire (= échantillons de laboratoire).

Pour les grands plans complexes comportant plus de 20 sites de prélèvement, les échantillons d'eau sont recueillis dans plusieurs bouteilles PET, qui sont ensuite transvasées dans un bidon de 5 l (revêtu d'un sac en plastique) avant de remplir les éprouvettes pour l'analyse en laboratoire.



## Cas spéciaux

En fonction de la problématique, d'autres approches peuvent être judicieuses, par exemple :

- Échantillonnage séparé des plans d'eau temporaires et permanents au sein du plan complexe.

*Fondamentalement, tous les plans d'eau peuvent être répartis en deux catégories :*

- A) grands plans d'eau permanents (étangs, mares) ;*
- B) petits plans d'eau (temporaires).*

*Les deux groupes sont traités chacun comme un plan complexe. Entre les échantillonnages des eaux du groupe A et du groupe B, il faut éliminer tout le matériel jetable et nettoyer l'outil de prélèvement.*

- Échantillonnage séparé de plans d'eau qui sont des habitats potentiels de l'espèce cible visée.

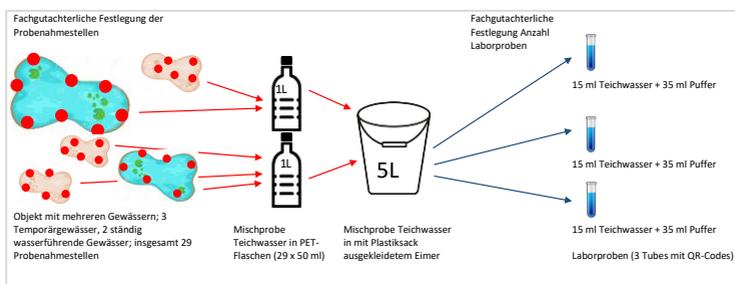
## 9. Exemple pratique

### Situation initiale

Au moyen de relevés de terrain et de relevés par ADNe, on veut recenser tout le spectre des espèces d'amphibiens qui peuplent un site (plan complexe) comprenant des plans d'eau temporaires et permanents.

### Conception du recensement

Le recensement combinera simultanément deux relevés de terrain « classiques » et deux relevés par ADNe à deux moments distincts de la saison, soit dans la première moitié d'avril (ponte précoce) et à la mi-mai (ponte tardive). Pour chacun des deux relevés par ADNe, on constituera un échantillon mixte pour tous les plans d'eau et l'on enverra au laboratoire trois éprouvettes pourvues d'un code QR.



### Données

En plus des résultats des relevés de terrain « classiques », on disposera de 6 jeux de données (2x3 échantillons de laboratoire) pour les relevés par ADNe. On peut donc estimer que, de la sorte, tout le spectre des espèces d'amphibiens peuplant le plan complexe sera couvert.

### Matériel d'usage nécessaire

« Kit ADNe ARNAL »		Nombre
<input checked="" type="checkbox"/>	Gants en plastique	2*1 = 2 paires
<input checked="" type="checkbox"/>	Tube de prélèvement / éprouvettes (50 ml)	2*1 = 2 (pour le prélèvement) 2*3 = 6 (pour les échantillons de laboratoire)
<input checked="" type="checkbox"/>	Bouteille PET (0,5 à 1 l)	2*2 = 4
<input checked="" type="checkbox"/>	Tampon standard (déjà dans les éprouvettes)	6*0,35 ml = 210 ml
<input checked="" type="checkbox"/>	Éprouvette avec tampon de réserve	2*1 = 2
<input checked="" type="checkbox"/>	Râteliers	2*1 = 2
<input checked="" type="checkbox"/>	Codes QR préimprimés à coller sur les éprouvettes	2*3 = 6

### Matériel supplémentaire (à se procurer soi-même)

<input checked="" type="checkbox"/>	Sacs en plastique pour recouvrir le bidon	2*1 = 2
<input checked="" type="checkbox"/>	Serviettes en papier	2*5 = 10

## 10. Glossaire

Visite	Visite sur le terrain dans le but de prélever des échantillons d'eau et de laboratoire.
Plan unique	Plan d'eau sans connexion directe avec d'autres plans d'eau.
Plan complexe	Ensemble de plans d'eau connectés entre eux qui font l'objet d'un échantillonnage collectif (échantillons de laboratoire pour le site) ou à titre individuel (un échantillon pour chaque plan d'eau).
Échantillon d'eau	Échantillon prélevé dans un plan d'eau avec le tube de prélèvement. Il est ensuite mélangé avec d'autres échantillons d'eau dans la bouteille PET.
Échantillon de laboratoire	Échantillon d'eau dans l'éprouvette pourvue d'un code QR, mélangé avec le tampon. Il est ensuite transmis au laboratoire pour analyse.
Échantillon mixte	Échantillons d'eau mélangés dans la bouteille PET.
Site	Plan d'eau unique ou plan complexe dont tous les échantillons prélevés sont mélangés et envoyés au laboratoire comme un seul échantillon de laboratoire.
Site de prélèvement	Lieu où l'échantillon d'eau est prélevé.
Échantillons de projet	Échantillons envoyés au laboratoire qui doivent être analysés jusqu'à la date fixée par le client. Le coût des échantillons diminue avec le nombre d'échantillons envoyés.
Râtelier	Support pour l'entreposage des éprouvettes.
Échantillon collectif	Échantillons envoyés au laboratoire qui doivent être analysés pour une date fixe avec tous les autres échantillons de laboratoire envoyés. Le coût par échantillon est fixe.
SSF	Sampling Submission Form (rapport d'envoi des échantillons au laboratoire).

# 11. Offre et prix courants

## Kit de départ pour un site

Prix\* : CHF 42.-- (+ frais de port)  
+ CHF 4.-- pour éprouvette (analyses de laboratoire) additionnelle

Contenu :

- 1 éprouvette avec code QR ; y c. tampon pour analyses de laboratoire (35 ml)
- 1 Tube de prélèvement (échantillon d'eau)
- 1 Tampon de remplacement (35 ml)
- Documentation Méthode de prélèvement
- Râtelier (gratuit ; à retourner avec les échantillons de laboratoire)
- 2 bouteilles PET (pour prélèvement + réserve)
- Gants jetables

## Kit complémentaire

(pour chaque site supplémentaire)

Prix\* : CHF 8.-- (+ frais de port)  
+ CHF 4.-- pour éprouvette (analyses de laboratoire) additionnelle

Contenu :

- 1 éprouvette avec code QR ; y c. tampon pour analyses de laboratoire (35 ml)
- 1 Tube de prélèvement (échantillons d'eau)
- Râtelier (gratuit ; à retourner avec les échantillons de laboratoire)
- Bouteille PET y c. réserve (selon le nombre de sites)
- Gants jetables

## Outils

- Outil de prélèvement : CHF 90.-- (+ frais de port)

## Frais de laboratoire Monitoring des amphibiens – Échantillon collectif

- Prix par analyse (1 échantillon de laboratoire)\* : CHF 220.--

Remarque : les échantillons de laboratoire sont analysés à une date fixe (31 juillet 2019). Les analyses peuvent être proposées à un bas coût grâce au regroupement des échantillons de tous les bureaux. Le délai de livraison des résultats est de cinq semaines à compter de la date fixée. Le nombre d'échantillons envoyés n'a aucune influence sur le coût par échantillon.

## Frais de laboratoire Monitoring des amphibiens – Échantillons de projet

Nombre d'échantillons de laboratoire	Frais de laboratoire par analyse (CHF)*
1	1800.00
2	1000.00
3-4	700.00
5-8	550.00
9-16	400.00
17-24	300.00
24-48	250.00
49-100	220.00
>100	190.00

Remarque : les échantillons de laboratoire peuvent être remis en tout temps. Le délai de livraison des résultats est de cinq semaines à compter de la réception des échantillons. Le coût des analyses est dégressif.

\* Prix indicatifs. En fonction de la méthode, il faut prévoir plusieurs analyses par site.

## 12. Commandes

La quantité nécessaire de matériel sera calculée et préparée sur la base du nombre de sites, de visites et d'échantillons de laboratoire indiqué. Pour les cas complexes, veuillez prendre contact préalablement par téléphone ou par courrier électronique.

<p><b>Commande 1</b></p> <p><input type="checkbox"/> Plan unique <input type="checkbox"/> Plan complexe</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <tr> <td style="width: 70%;">Nombre de sites</td> <td style="width: 30%;"></td> </tr> <tr> <td>Nombre de visites</td> <td></td> </tr> </table> <p>Analyse :</p> <p><input type="checkbox"/> Échantillon collectif <input type="checkbox"/> Échantillons de projet</p>	Nombre de sites		Nombre de visites		<p><b>Commande 2</b></p> <p><input type="checkbox"/> Plan unique <input type="checkbox"/> Plan complexe</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <tr> <td style="width: 70%;">Nombre de sites</td> <td style="width: 30%;"></td> </tr> <tr> <td>Nombre de visites</td> <td></td> </tr> </table> <p>Analyse :</p> <p><input type="checkbox"/> Échantillon collectif <input type="checkbox"/> Échantillons de projet</p>	Nombre de sites		Nombre de visites	
Nombre de sites									
Nombre de visites									
Nombre de sites									
Nombre de visites									

### Matériel supplémentaire

	Quantité	Nombre
Outil de prélèvement (CHF 90.00)	1	

Remarques:

---



---



---



---



---



---

Commande par courrier électronique à l'adresse [assistentz@arnal.ch](mailto:assistentz@arnal.ch) (objet : ADNe Amphibiens) ou par courrier postal à ARNAL AG, Kasernenstrasse 37, 9100 Herisau