

Comparaison des méthodes de piégeage et d'ADN environnemental pour la détection et la quantification de la tortue mouchetée en Outaouais

MINISTÈRE DES FORÊTS, DE LA FAUNE ET DES PARCS



Photographie de la page couverture :

Tortue mouchetée, © Jean Lapointe

© Gouvernement du Québec

Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs

Dépôt légal - Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2022

ISBN (PDF) : 978-2-550-92871-3

Équipe de réalisation

Rédaction

Gabrielle Fortin, biologiste, M. Sc.	Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP), Direction de l'expertise sur la faune terrestre, l'herpétofaune et l'avifaune (DEFTHA) (au moment de la rédaction du document)
Guillaume Côté, professionnel de recherche	MFFP, Direction de l'expertise sur la faune aquatique (DEFA)

Révision

Yohann Dubois, biologiste, M. Sc. Chef d'équipe, Division du rétablissement	MFFP, Service de la conservation de la biodiversité et des milieux humides (SCBMH)
Christine Dumouchel, biologiste, M. Env.	MFFP, SCBMH
Sylvain Giguère, biologiste	Service canadien de la faune (SCF), Environnement et Changement climatique Canada (ECCC)
Antoine Nappi, biologiste, Ph. D. Chef de service, SCBMH	MFFP, SCBMH
Simon Pelletier, technicien de la faune	MFFP, Service de la gestion des espèces et des habitats terrestres (SGEHT)

Collecte et analyse de données

Guillaume Côté, professionnel de recherche	MFFP, DEFA
Cécilia Hernandez, professionnelle de recherche	Institut de biologie intégrative et des systèmes (IBIS), Université Laval
Louis Bernatchez, professeur	IBIS, Université Laval
Simon Pelletier, technicien de la faune	MFFP, SGEHT
Gabrielle Fortin, biologiste M. Sc.	MFFP, DEFTHA

Remerciements

Nous tenons à remercier les techniciennes et techniciens de la faune et les biologistes de la direction régionale de la gestion de la faune de l'Outaouais pour leurs excellentes contribution, collaboration et expertise dans la réalisation de ce projet, dont particulièrement James Hayes, Olivier Trudel, Jocelyn Caron et Pamela Garcia-Cournoyer ainsi que Caroline Gagné de Conservation de la nature Canada.

Référence à citer

FORTIN, G. et G. CÔTÉ (2022). *Comparaison des méthodes de piégeage et d'ADN environnemental pour la détection et la quantification de la tortue mouchetée en Outaouais*, ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, Direction de l'expertise sur la faune terrestre, l'herpétofaune et l'avifaune, Service de la conservation de la biodiversité et des milieux humides, gouvernement du Québec, Québec, 23 p.

Avant-propos

Le présent rapport expose les résultats d'une étude menée à l'été 2016. Les techniques utilisées pour l'échantillonnage et l'analyse de l'ADN environnemental (ADNe) présentées dans ce rapport sont celles qui étaient en vigueur à ce moment-là. Comme l'ADNe est une méthode récente et en développement, plusieurs modifications et améliorations aux techniques et matériels ont eu lieu au courant des dernières années. Le rapport permet de présenter les résultats obtenus à l'aide de ces techniques, et le lecteur est invité à consulter les deux protocoles ci-dessous publiés récemment par le Ministère. Ceux-ci intègrent les avancées et les adaptations apportées aux techniques maintenant préconisées pour l'utilisation de l'ADNe dans les inventaires fauniques.

- [*Protocole standardisé pour l'inventaire des tortues d'eau douce à l'aide de l'ADNe au Québec*](#) (MFFP, 2022)
- [*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*](#) (MFFP, 2021)

Résumé

Le plan de rétablissement pour la tortue mouchetée au Québec prévoit le maintien ou la croissance des populations connues. Il est donc nécessaire d'obtenir une estimation de la taille des populations d'une espèce et de mettre en place un suivi à long terme afin d'évaluer les tendances démographiques. Le but de ce projet de recherche est de tester l'efficacité de la méthode de récolte et d'analyse d'ADN environnemental (ADNe) pour détecter la présence et évaluer l'abondance de la tortue mouchetée dans différents secteurs de l'Outaouais. Les objectifs précis sont de 1) évaluer la capacité de la méthode d'ADNe pour détecter et quantifier la présence de la tortue mouchetée, 2) comparer le signal détecté par la méthode d'ADNe à celui de la méthode de piégeage traditionnel et 3) comparer l'efficacité et le signal détecté par deux méthodes de filtration des échantillons d'ADNe.

L'étude a été menée à l'été 2016 dans six milieux humides situés dans la partie québécoise de la vallée de l'Outaouais et le parc de la Gatineau. Des échantillons d'eau ont été récoltés dans les milieux humides et filtrés à l'aide de deux méthodes, soit avec une pompe péristaltique et avec une seringue. Un effort de piégeage systématique a été déployé dans les mêmes milieux, après la collecte des échantillons d'ADNe. Des amorces spécifiques à la tortue mouchetée ont été développées par l'Université Laval, qui a par la suite réalisé les analyses génétiques sur l'eau récoltée par les deux méthodes.

Un total de 240 jours-pièges ont été déployés lors de l'inventaire par piégeage. Un total de 22 tortues mouchetées ont été capturées, incluant 18 captures par piégeage et 4 captures opportunistes à la main. La méthode de filtration avec une pompe a permis de détecter la présence d'ADNe de tortue mouchetée dans 5 des 6 sites à l'étude. La méthode de filtration avec une seringue a permis de détecter la présence d'ADNe de tortue mouchetée dans l'ensemble des 4 sites à l'étude pour cette méthode. Le site de Shawville – Cycloparc est le seul site où l'ADNe de tortue mouchetée a été retrouvé à toutes les stations, et ce, pour les deux méthodes. L'analyse par PCR quantitative (PCRq) devait aussi être utilisée pour obtenir une quantification relative de l'ADNe de tortue mouchetée. Par contre, en raison du faible nombre d'amplifications positives, ce type d'analyse n'a pas pu être réalisé.

Pour les deux méthodes de filtration des échantillons d'ADNe, l'ADN de tortue mouchetée a été détecté dans l'ensemble des sites échantillonnés, à l'exception du site d'Eardley-Masham. La méthode de filtration avec une pompe apparaît plus efficace que la filtration avec une seringue, car le taux de détection de l'ADN de tortue mouchetée était supérieur. En effet, le volume d'eau pour la méthode de filtration avec pompe est plus grand que celui pour la méthode avec seringue. Le taux de détection de l'ADN de la tortue mouchetée est somme toute faible pour les deux méthodes de filtration lorsqu'on considère les amplifications positives totales. Le taux de détection de l'ADN de la tortue mouchetée pour les deux méthodes de filtration ne semble pas lié à sa détection par la méthode traditionnelle de piégeage. La méthode d'ADNe semble permettre une détection de type présence/absence pour la tortue mouchetée, mais ne permet pas d'estimer l'abondance de l'espèce avec le protocole utilisé.

Afin de mettre en place un protocole d'inventaire qui permettrait d'évaluer le lien entre l'abondance estimée par ADNe et celle estimée par piégeage, il est recommandé de 1) augmenter l'effort de piégeage, 2) optimiser la période de piégeage, 3) augmenter le nombre de stations d'échantillonnage par ADNe et 4) optimiser la méthode de filtration.

Table des matières

Introduction	1
Contexte	1
Objectifs.....	1
Méthodologie	2
Aire d'étude.....	2
Collecte d'ADN environnemental	2
Inventaire par piégeage	3
Mesures et échantillons biologiques	3
Analyses génétiques.....	3
Extraction et PCR quantitative	3
Développement des amorces et des sondes spécifiques	4
Tests de PCRq.....	5
Séquençage.....	5
Résultats	5
Analyses génétiques.....	10
Développement des amorces et sonde	10
Détection de l'ADNe de la tortue mouchetée.....	10
Discussion	11
Comparaison des méthodes	11
Recommandations	18
Conclusion	19
Références	20
Annexe 1 – Protocole d'extraction d'ADN pour la méthode de filtration avec pompe péristaltique ou pompe vacuum	22
Annexe 2 – Protocole d'extraction d'ADN pour la méthode de filtration avec seringue	23

Liste des tableaux

Tableau 1. Évaluation préliminaire de l'abondance de la tortue mouchetée à chaque site d'étude	2
Tableau 2. Liste des espèces de tortues du Québec dont l'ADN a été récolté par prise de sang afin de tester des amorces spécifiques à la tortue mouchetée pour la PCRq.	5
Tableau 3. Sommaire des captures de tortues lors de l'inventaire de 2016.	6
Tableau 4. Superficie inventoriée et sommaire des captures par piégeage aux sites ciblés en 2016.	6
Tableau 5. Amorces et sonde à utiliser dans ce projet pour la détection de l'ADN de la tortue mouchetée dans les échantillons d'ADN environnemental.	10
Tableau 6. Détection de l'ADNe de tortue mouchetée avec la méthode de filtration par pompe	10
Tableau 7. Détection de l'ADNe de tortue mouchetée avec la méthode de filtration par seringue.	10

Liste des figures

Figure 1.	Localisation des pièges, captures de tortues et échantillons d'ADN environnemental au site de Shawville – Cycloparc.....	7
Figure 2.	Localisation des pièges, captures de tortues et échantillons d'ADN environnemental au site de Shawville – 7 ^e concession.....	7
Figure 3.	Localisation des pièges, captures de tortues et échantillons d'ADN environnemental au site de Bristol – Chemin sans nom.....	8
Figure 4.	Localisation des pièges, captures de tortues et échantillons d'ADN environnemental au site du parc de la Gatineau – Ouest.....	8
Figure 5.	Localisation des pièges, captures de tortues et échantillons d'ADN environnemental au site du parc de la Gatineau – Milieu 2.....	9
Figure 6.	Localisation des pièges, captures de tortues et échantillons d'ADN environnemental au site du parc de la Gatineau – Eardley-Masham.....	9
Figure 7.	Détection de la tortue mouchetée par les méthodes d'ADN environnemental et de piégeage au site de Shawville – Cycloparc.....	12
Figure 8.	Détection de la tortue mouchetée par les méthodes d'ADN environnemental et de piégeage au site de Shawville – 7 ^e concession.....	12
Figure 9.	Détection de la tortue mouchetée par les méthodes d'ADN environnemental et de piégeage au site de Bristol – Chemin sans nom.....	13
Figure 10.	Détection de la tortue mouchetée par les méthodes d'ADN environnemental et de piégeage au site du parc de la Gatineau – Ouest.....	13
Figure 11.	Détection de la tortue mouchetée par les méthodes d'ADN environnemental et de piégeage au site du parc de la Gatineau – Milieu 2.....	14
Figure 12.	Détection de la tortue mouchetée par les méthodes d'ADN environnemental et de piégeage au site du parc de la Gatineau – Eardley-Masham.....	14
Figure 13.	Comparaison du pourcentage de stations auxquelles la tortue mouchetée a été détectée par la méthode d'ADN environnemental avec A) le nombre de tortues mouchetées détectées par piégeage et B) la superficie inventoriée par piégeage.....	15
Figure 14.	Comparaison du pourcentage de répliquats dans lesquels la tortue mouchetée a été détectée par la méthode d'ADN environnemental avec A) le nombre de tortues mouchetées détectées par piégeage et B) la superficie inventoriée par piégeage.....	16

Introduction

Contexte

La plupart des espèces animales en situation précaire au Québec sont dotées d'un plan de rétablissement qui prévoit le maintien ou la croissance de leurs populations connues. Afin d'atteindre cet objectif de rétablissement, il est nécessaire d'obtenir une estimation de la taille des populations d'une espèce et de mettre en place un suivi à long terme afin d'évaluer leurs tendances démographiques. Le plan de rétablissement de la tortue mouchetée (*Emydoidea blandingii*) au Québec — 2020-2030 inclut l'adoption d'un protocole détaillé permettant l'obtention d'estimations de tailles de populations comparables d'une année à l'autre et d'un secteur à l'autre (Équipe de rétablissement des tortues du Québec, 2020). L'effort de suivi permettra, entre autres, d'évaluer l'efficacité des mesures mises en place pour l'atténuation et la réduction des menaces pesant sur les populations de tortues mouchetées du Québec.

Une méthode traditionnelle pour inventorier la tortue mouchetée, tout comme les autres tortues habitant les milieux humides, consiste à déployer des verveux dans les zones d'eau peu profonde propices à l'espèce pour une durée fixe et à dénombrer les individus capturés. Jones et coll. (2012) présentent des méthodes standardisées qui permettent de réaliser un suivi des populations de tortues mouchetées par piégeage. L'effort minimal requis pour évaluer la présence et l'abondance de l'espèce est de 80 jours-pièges par site d'un rayon d'environ 1 km. Des inventaires faits dans la région de l'Outaouais ont également noté un effort moyen de 20 jours-pièges pour capturer une tortue mouchetée (Dubois et coll., 2011). Il apparaît donc évident que le suivi des populations de tortues mouchetées par piégeage demande des ressources humaines et matérielles importantes.

Une autre méthode d'inventaire, la méthode d'ADN environnemental (ADNe) est de plus en plus utilisée pour repérer la présence d'espèces animales en milieu aquatique et elle est particulièrement utile pour détecter des espèces cryptiques. Une étude sur la détection de la tortue des bois par la méthode d'ADNe a été menée en 2013 par l'Université Laval en collaboration avec le ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (Lacoursière-Roussel et coll., 2016). Cette étude a montré que l'utilisation de la PCR quantitative (PCRq) pour estimer l'abondance de la tortue des bois au Québec était d'efficacité comparable à celle des inventaires visuels traditionnels pour cette espèce. Étant donné que la méthode d'ADNe demande moins de temps et de ressources lors des travaux de terrain que les inventaires visuels et par piégeage, il est pertinent de déterminer si elle peut être utilisée pour détecter la tortue mouchetée.

Objectifs

Le but de ce projet de recherche est de tester l'efficacité de la méthode de récolte et d'analyse d'ADNe pour détecter la présence et évaluer l'abondance de la tortue mouchetée dans différents secteurs de l'Outaouais. Les objectifs précis sont de 1) évaluer la capacité de la méthode d'ADNe pour détecter et quantifier la présence de la tortue mouchetée, 2) comparer le signal détecté par la méthode d'ADNe à celui de la méthode de piégeage traditionnel et 3) comparer l'efficacité et le signal détecté par deux méthodes de filtration des échantillons d'ADNe.

Méthodologie

Aire d'étude

L'aire d'étude est située le long de la partie québécoise de la vallée de l'Outaouais et dans le parc de la Gatineau. Des études antérieures ont démontré l'importance de cette aire pour la conservation de l'habitat de la tortue mouchetée (Environnement Canada, 2016; Dubois et coll., 2012; Fortin et coll., 2012). À l'intérieur de cette aire, six milieux humides d'intérêt (sites) ont été choisis pour représenter un gradient d'abondance de la tortue mouchetée (tableau 1). L'abondance relative de l'espèce à chaque site a été évaluée selon les résultats des activités de piégeage présentés dans Dubois et coll., 2012.

Tableau 1. Évaluation préliminaire de l'abondance de la tortue mouchetée à chaque site d'étude.

Secteur	Site	Abondance
Shawville	Cycloparc	Élevée
Shawville	7 ^e concession	Moyenne
Bristol	Chemin sans nom	Moyenne
Parc de la Gatineau	Ouest	Moyenne
Parc de la Gatineau	Milieu 2	Faible
Parc de la Gatineau	Earldey-Masham	Faible

Collecte d'ADN environnemental

Des échantillons d'eau ont été récoltés entre le 4 et le 8 juillet 2016 aux six sites mentionnés au tableau 1. Les échantillons d'eau ont été récoltés avant la pose et l'appâtage des pièges afin d'éviter le brassage des sédiments dans les milieux humides visés, mais principalement pour éviter de mesurer un signal positif induit par les activités de piégeage elles-mêmes. Avant la collecte des échantillons d'eau sur le terrain, tout l'équipement a été désinfecté avec une solution d'eau de Javel à 10 % (une partie d'eau de Javel dans neuf parties d'eau), puis rincé à l'eau distillée afin d'éviter les faux positifs.

Pour chaque site, neuf échantillons de 1 L d'eau ont été récoltés aux endroits prévus pour la pose des pièges afin de pouvoir comparer le signal obtenu par les deux méthodes. Les pièges ont été déployés selon une méthode systématique décrite à la prochaine section. Pour chaque échantillon, la bouteille de 1 L a été conditionnée avec l'eau du milieu humide. L'échantillon était récolté au milieu de la colonne d'eau, en évitant de remettre de la matière organique en suspension. Les bouteilles d'eau étaient conservées sur glace pendant maximum 8 heures, puis étaient filtrées en laboratoire à l'aide d'une pompe péristaltique. L'appareil de filtration et la surface de travail ont été nettoyés entre chaque échantillon avec une solution d'eau de Javel à 10 %, puis rincés à l'eau distillée. Entre chaque site, trois filtrations étaient faites avec de l'eau distillée, afin de servir de témoin négatif de filtration pour les trois lignes de filtration de la pompe. Les gants étaient changés à chaque filtration. La filtration avait lieu en 5 étapes :

- 1) Nettoyer la surface de travail;

- 2) Stériliser le train de filtration;
- 3) Rincer le train de filtration;
- 4) Filtrer les échantillons;
- 5) Congeler les filtres.

Avant d'être congelés, les filtres étaient emballés soigneusement dans du papier d'aluminium et identifiés. Les filtres ont été conservés à -20 °C jusqu'au moment de l'extraction d'ADN.

Pour quatre des sites, une deuxième méthode de collecte d'ADNe a été testée aux mêmes neuf stations afin de comparer l'efficacité des deux méthodes. Pour chaque échantillon, 1 L d'eau du milieu humide a été prélevé tel que décrit précédemment, puis un total de 250 mL (5 x 50 mL) a été filtré directement sur le terrain à l'aide d'une seringue stérile attachée à une tête contenant le filtre. Les filtres étaient placés dans un tube de 2 mL contenant 700 µl de tampon Longmire. Les filtres ont été conservés à 4 °C pendant une nuit et ensuite conservés à -20 °C jusqu'au moment de l'extraction d'ADN. Les têtes de filtres étant réutilisables, elles étaient désinfectées avec une solution d'eau de Javel à 10 %, puis rincées à l'eau distillée avant chaque utilisation. Un blanc de filtration était réalisé pour tester l'ensemble des têtes de filtres après désinfection, en filtrant 250 mL d'eau distillée.

Inventaire par piégeage

Un effort de piégeage systématique a été déployé entre le 11 et le 22 juillet 2016 dans les six sites sélectionnés afin d'obtenir des données sur la détection de la tortue mouchetée par piégeage. Pour chaque site de piégeage, 10 verveux (sans guideau, 30 ou 36 pouces de diamètre, mailles étirées de 3 pouces) ont été déployés dans les habitats les plus propices pour la tortue mouchetée, soit les zones peu profondes en bordure des milieux humides, avec présence d'une végétation aquatique abondante (Environnement Canada, 2016). Les verveux ont été appâtés avec des sardines à l'huile en conserve, déployés pendant quatre jours-pièges consécutifs, et relevés quotidiennement.

Mesures et échantillons biologiques

Les tortues mouchetées capturées ont été sexées par forme du plastron, pesées à l'aide d'une balance à ressort et mesurées avec un vernier forestier. Les individus capturés pour la première fois ont été marqués d'une petite encoche dans la bordure kératinisée de la dossière, à l'aide d'une lime ronde de 6 mm pour permettre de distinguer et compter adéquatement les individus. Des échantillons de sang de 0,2 à 0,5 mL ont été prélevés dans la veine caudale de trois individus par espèce pour les tortues mouchetée, peinte et serpentine, afin de récolter de l'ADN pour la création d'amorces spécifiques à la tortue mouchetée par l'Université Laval.

Analyses génétiques

Les filtres contenant l'ADNe ainsi que les contrôles négatifs de filtration ont été analysés par le laboratoire de Louis Bernatchez à l'Université Laval.

Extraction et PCR quantitative

Pour l'échantillonnage réalisé avec une pompe péristaltique, l'ADNe sur les filtres a été extrait selon le protocole de Goldberg et coll. (2011) adapté à la porosité des filtres Whatman GF/C (voir l'annexe 1

pour le protocole détaillé). Pour l'échantillonnage réalisé avec une seringue, l'ADNe sur les filtres a été extrait selon le protocole basé sur Deiner et coll. (2015) et Renshaw et coll. (2014) (voir l'annexe 2 pour le protocole détaillé). L'ADNe extrait a ensuite été congelé à -20 °C jusqu'à l'amplification. L'ADNe a été amplifié en PCR quantitative (PCRq, ou PCR en temps réel) à l'aide de l'appareil PCR 7500 Fast Real-Time (Life Technologies). Les amorces et les sondes spécifiques ainsi que leur efficacité respective sont présentées dans ce rapport. Le volume de réaction final était de 20 µl; incluant 1,8 µl de chaque amorce (10µM), 0,5 µl de sonde (10 µM), 10 µl Environmental Master Mix 2.0 (Life Technologies), 3,9 µl de SPUD (Sigma-Aldrich) et 2 µl d'ADN. Le SPUD étant utilisé comme un contrôle positif interne, il permet d'évaluer l'efficacité de l'amplification et la présence possible d'inhibiteurs dans l'échantillon. L'amplification en PCRq a été réalisée dans les conditions suivantes : 2 min à 50 °C, 10 min à 95 °C, suivies par 50 cycles de 15 s à 95 °C et de 60 s à 60 °C. La spécificité des amorces a été évaluée par séquençage Sanger pour l'ensemble des échantillons ayant amplifié positivement.

En PCRq, la dégradation de la sonde s'accompagne de fluorescence et le niveau de fluorescence est mesuré en temps réel au cours de chaque cycle de PCR. La PCRq permet ainsi de déterminer le cycle de PCR où le seuil de détection de la fluorescence est atteint (Ct); plus le nombre de copies d'ADN est élevé, plus le seuil est atteint rapidement et plus la valeur de Ct est faible. La présence de l'ADN des espèces cibles dans les échantillons d'eau est confirmée lorsqu'il y a amplification et que celle-ci est suffisante pour atteindre le seuil de détection de la fluorescence. Dans le cadre de cette étude, la présence de l'ADN de tortue mouchetée a été détectée en PCRq sur six réplicats pour chaque échantillon. Pour avoir une présence positive, l'amplification devait être présente dans au moins un réplicat. Des témoins négatifs de terrain, de PCR et d'extraction ont aussi été ajoutés à l'analyse pour s'assurer de l'absence de contamination. Un témoin négatif de terrain permet d'évaluer si le matériel utilisé pour la filtration a été décontaminé correctement entre les sites d'échantillonnage. Un témoin négatif de PCR permet de déterminer si un des composants de la PCR est contaminé avec l'ADN de l'espèce cible. La présence d'un signal d'amplification positif dans le témoin négatif indique qu'un signal positif dans les échantillons de terrain n'est pas concluant puisque le signal peut être le résultat de la contamination. Le témoin négatif d'extraction permet, quant à lui, d'éliminer la contamination possible par les solutions d'extraction. L'utilisation de témoins négatifs permet d'éviter au maximum les faux positifs.

Développement des amorces et des sondes spécifiques

Puisque l'eau des plans d'eau échantillonnés contient vraisemblablement de l'ADN de toutes les espèces vivant au sein de ce milieu, la spécificité des amorces utilisées lors de la PCRq est extrêmement importante. Des amorces non spécifiques pourraient faussement indiquer la présence de tortues mouchetées si elles amplifient l'ADN d'une autre espèce et qu'aucune confirmation par séquençage n'est effectuée.

Le développement d'amorces et de sondes spécifiques est basé sur l'utilisation du gène mitochondrial cytochrome oxydase sous-unité I (COI). Celui-ci est utilisé universellement dans les analyses d'ADN et il est reconnu pour son efficacité à identifier les organismes à l'espèce (Hebert et coll., 2003; April et coll., 2011). Les amorces et la sonde spécifiques ont été conçues pour maximiser le nombre de différences d'appariements entre l'espèce cible et les espèces apparentées possiblement présentes

dans le même milieu, tout en optimisant leurs positions de manière à ce qu'elles soient le plus près possible de la position 3' (Wilcox et coll., 2013). Les séquences de ces espèces ont été alignées dans le logiciel MEGA (Tamura et coll., 2013), et la conception des amorces et de la sonde a été réalisée à l'aide du logiciel Primer Express 3.0 (Life Technologies). La spécificité des amorces et de la sonde a été testée expérimentalement sur l'ADN extrait du sang de la tortue mouchetée ainsi que sur celui des espèces apparentées.

Tests de PCRq

Pour confirmer la spécificité des amorces, chaque paire d'amorces développées a été testée par PCRq avec l'ADN des espèces cibles et apparentées (voir tableau 2 pour la liste d'espèces). Les résultats de cette première PCRq ont permis la conception de sondes de manière à se concentrer sur les espèces apparentées plus problématiques. Les sondes développées ont par la suite été testées par PCRq avec l'ADN des espèces cibles et apparentées. Lors des essais, la quantité d'ADN de l'ensemble des espèces a été normalisée afin que la différence en Ct soit uniquement attribuable à l'efficacité du complexe amorces-sonde à amplifier l'ADN présent.

Tableau 2. Liste des espèces de tortues du Québec dont l'ADN a été récolté par prise de sang afin de tester des amorces spécifiques à la tortue mouchetée pour la PCRq.

Espèce cible	Espèces apparentées
tortue mouchetée (<i>Emydoidea blandingii</i>)	tortue serpentine (<i>Chelydra serpentina</i>) tortue peinte (<i>Chrysemys picta</i>) tortue géographique (<i>Graptemys geographica</i>) tortue musquée (<i>Sternotherus odoratus</i>) tortue des bois (<i>Glyptemys insculpta</i>)

Séquençage

Pour s'assurer de la spécificité des amorces et de la sonde, le produit PCR des échantillons positifs a été séquençé à la plateforme d'analyses génomiques (PAG) située à l'IBIS, Université Laval. Le séquençage Sanger a été réalisé à l'aide d'un séquenceur ABI 3130xl (Life Technologies). La séquence obtenue a été comparée avec les séquences pour l'espèce à l'étude dans les banques de données en utilisant l'outil « nucleotide BLAST » implémenté sur le site web du « National Center for Biotechnology Information » (NCBI).

Résultats

Un total de 240 jours-pièges ont été déployés lors de l'inventaire de 2016 dans six milieux humides de la région de l'Outaouais, à raison de 10 pièges par milieu humide. Un total de 22 tortues mouchetées ont été capturées lors de cet inventaire, incluant 18 captures par piégeage et 4 captures opportunistes à la main. Cinq individus capturés en 2016 avaient été capturés et marqués en 2010 et deux individus ont été recapturés 1 fois en 2016.

Les tableaux 3 et 4 montrent le nombre de captures réalisées pour toutes les espèces de tortues, par méthode et par site inventorié. Le tableau 3 présente de façon plus spécifique les captures réalisées par piégeage, dans l'intention de comparer l'abondance évaluée par piégeage avec celle évaluée par

l'analyse d'ADNe. Les figures 1 à 6 montrent à la fois l'emplacement des pièges et des captures pour toutes les espèces de tortues capturées lors de l'inventaire, ainsi que la localisation de tous les échantillons d'ADNe récoltés en 2016. La distance maximale entre la localisation d'un échantillon d'eau et le piège correspondant a été de 77 m.

Tableau 3. Sommaire des captures (nombre d'individus) de tortues lors de l'inventaire de 2016.

	Mâle	Femelle	Juvenile	Total
Tortue mouchetée				
Verveux	8	6	4	18
Main	0	4	0	4
Sous-total	8	10	4	22
Tortue peinte*				
Verveux	39	27	5	71
Main	1	0	0	1
Sous-total	40	27	5	72
Tortue serpentine* (verveux)	13 adultes		2	15
Total	99 adultes		11	110

Tableau 4. Superficie inventoriée et sommaire des captures par piégeage (nombre d'individus) aux sites ciblés en 2016 (EMBL = tortue mouchetée, CHPI = tortue peinte, CHSE = tortue serpentine).

Secteur	Site	Superficie (ha)**	EMBL	CHPI*	CHSE*
Shawville	Cycloparc	26,6	6	17	2
Shawville	7 ^e concession	19,2	0	34	0
Bristol	Chemin sans nom	14,7	4	4	5
Parc de la Gatineau	Ouest	14,6	2	3	2
Parc de la Gatineau	Milieu 2	15,5	6	3	5
Parc de la Gatineau	Eardley-Masham	24,7	0	11	1
Total		S. O.	18	72	15

* Il est possible que des recaptures soient comptées comme des individus différents car les tortues peintes et les tortues serpentes n'ont pas été marquées.

** La superficie inventoriée est ici définie comme celle d'une zone de 100 m de rayon autour des verveux, correspondant à la capacité de déplacement moyenne de la tortue mouchetée sur une période d'environ 3-4 jours (Dubois et coll. 2012).

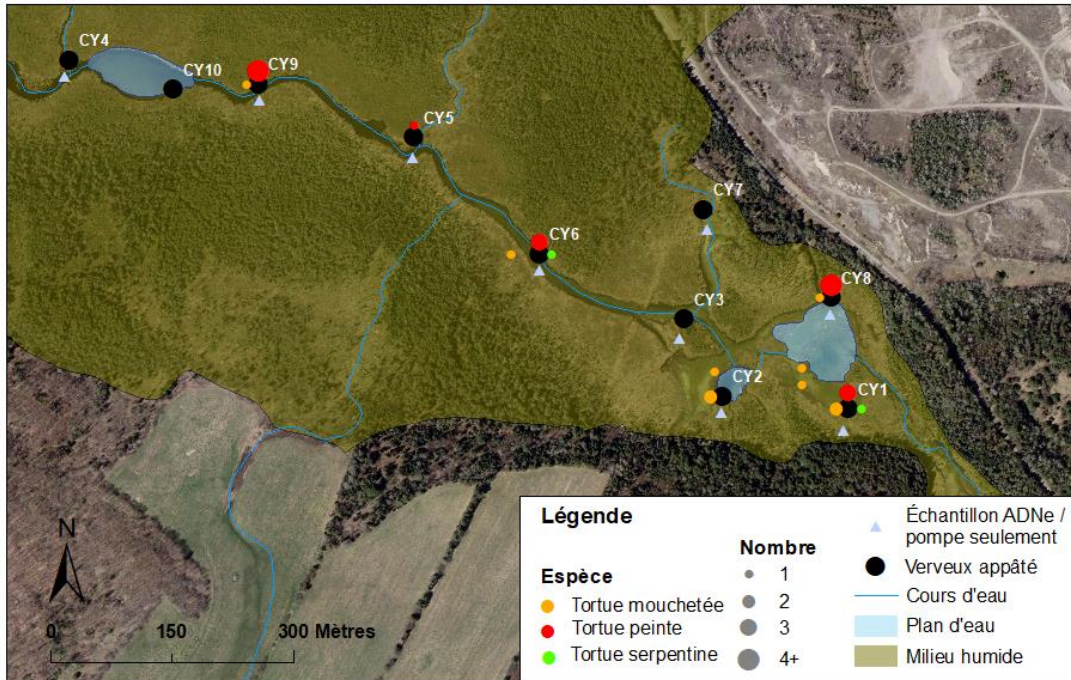


Figure 1. Localisation des pièges, captures de tortues et échantillons d'ADN environnemental au site de Shawville – Cycloparc.

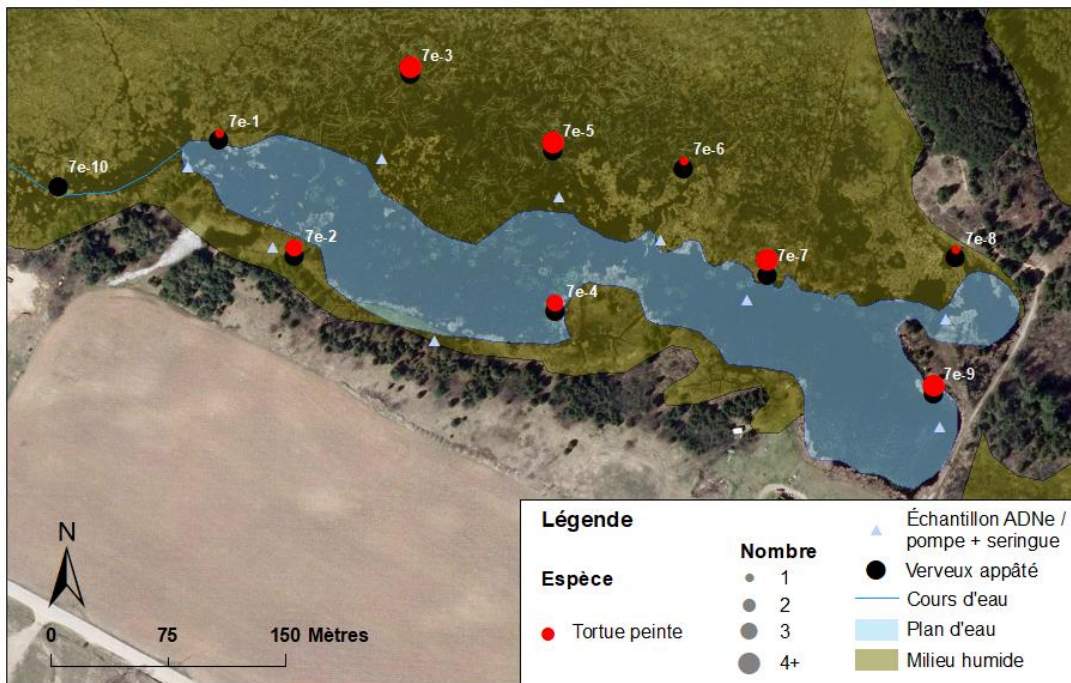


Figure 2. Localisation des pièges, captures de tortues et échantillons d'ADN environnemental au site de Shawville – 7^e concession.

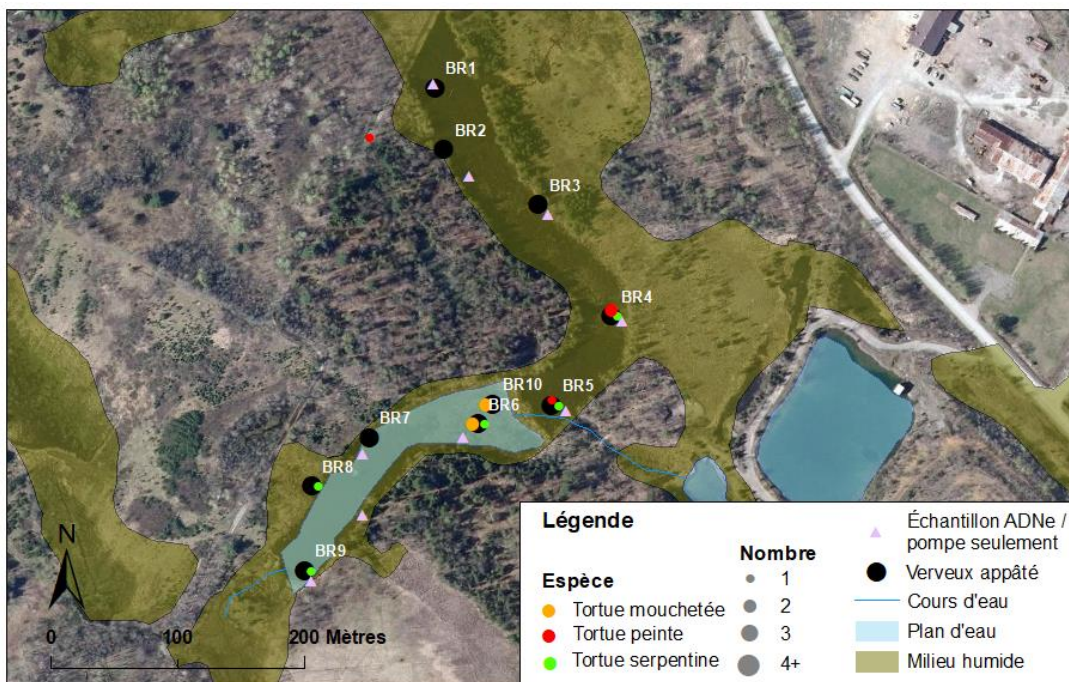


Figure 3. Localisation des pièges, captures de tortues et échantillons d'ADN environnemental au site de Bristol – Chemin sans nom.

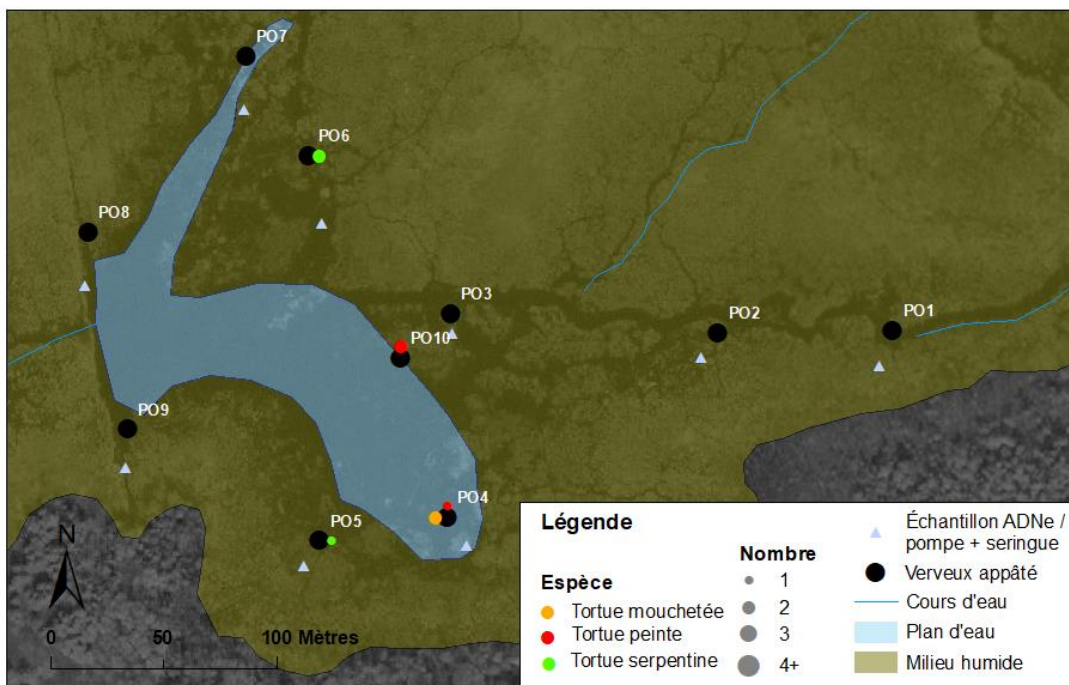


Figure 4. Localisation des pièges, captures de tortues et échantillons d'ADN environnemental au site du parc de la Gatineau – Ouest.

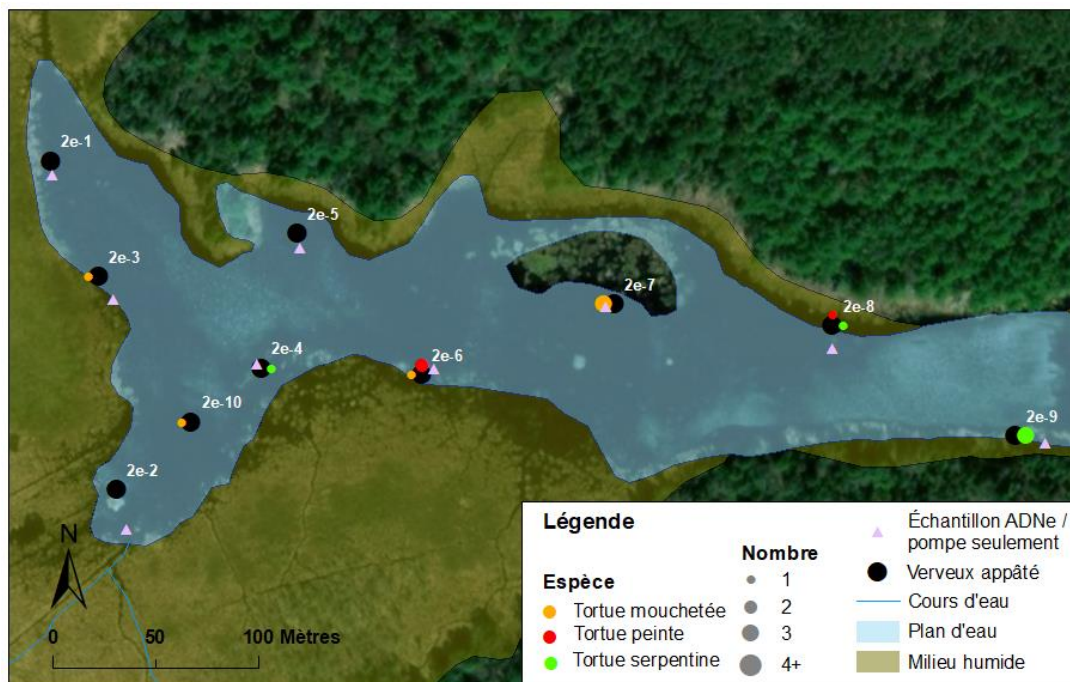


Figure 5. Localisation des pièges, captures de tortues et échantillons d'ADN environnemental au site du parc de la Gatineau – Milieu 2.

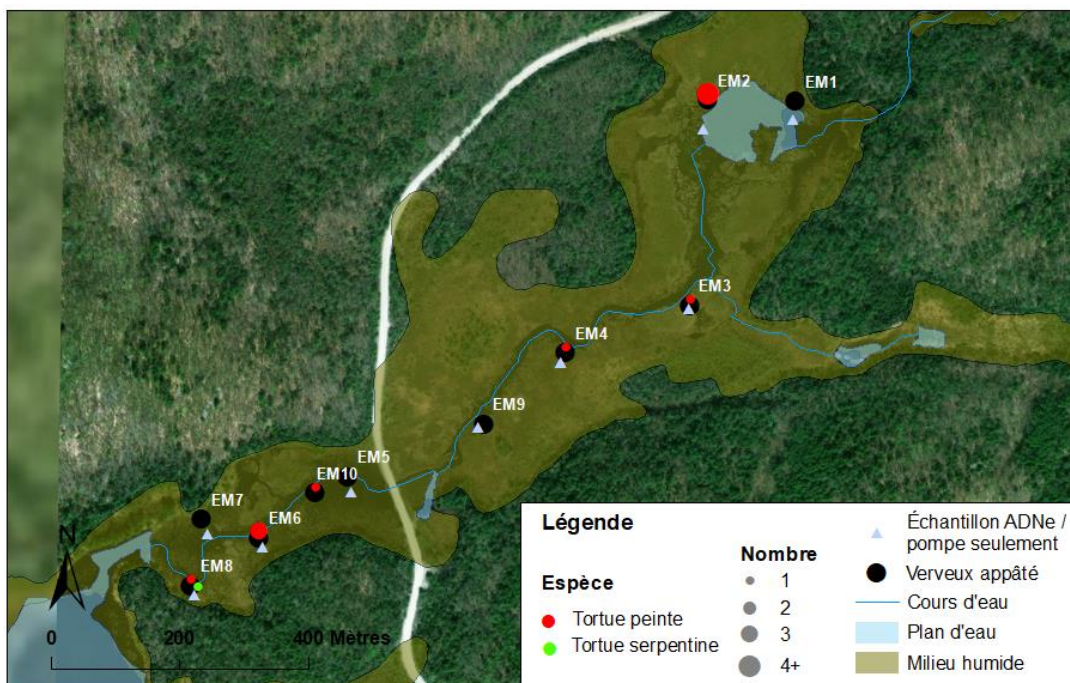


Figure 6. Localisation des pièges, captures de tortues et échantillons d'ADN environnemental au site du parc de la Gatineau – Eardley-Masham.

Analyses génétiques

Développement des amorces et sonde

Afin de détecter la présence de la tortue mouchetée dans les échantillons d'ADNe, les amorces et sonde suivantes ont été développées pour l'espèce (tableau 5).

Tableau 5. Amorces et sonde à utiliser dans ce projet pour la détection de l'ADN de la tortue mouchetée dans les échantillons d'ADN environnemental.

Espèce	Amorce sens	Amorce anti-sens	Sonde
Tortue mouchetée	ATCATCAGGAATTGAAGC AGGG	GGGATTTTATGTTAATTGCT GTGGTAATA	CTGAACTGTATATCCACCA CTA

Détection de l'ADNe de la tortue mouchetée

Pour les 2 méthodes de filtration, aucune amplification positive pour l'ADNe de tortue mouchetée n'a été obtenue avec les témoins négatifs de terrain, d'extraction et de PCR. Les tableaux 6 et 7 présentent la compilation des résultats pour la détection de l'ADNe de tortue mouchetée pour les 6 sites à l'étude. Pour chaque site, le nombre de stations ayant obtenu au moins une amplification positive parmi les 6 réplicats ainsi que le nombre total d'amplifications positives (9 stations x 6 réplicats par station) sont présentés.

Tableau 6. Détection de l'ADNe de tortue mouchetée avec la méthode de filtration par pompe.

Secteur	Site	Nbre de stations avec une amplification positive	Nbre d'amplifications positives
Shawville	Cycloparc	9/9 (100 %)	38/54 (70 %)
Shawville	7 ^e concession	6/9 (66 %)	10/54 (19 %)
Bristol	Chemin sans nom	3/9 (33 %)	13/54 (24 %)
Parc de la Gatineau	Ouest	3/9 (33 %)	9/54 (17 %)
Parc de la Gatineau	Milieu 2	1/9 (11 %)	1/54 (2 %)
Parc de la Gatineau	Eardley-Masham	0/9 (0 %)	0/54 (0 %)

Tableau 7. Détection de l'ADNe de tortue mouchetée avec la méthode de filtration par seringue.

Secteur	Site	Nbre de stations avec une amplification positive	Nbre d'amplifications positives
Shawville	Cycloparc	4/9 (44 %)	16/54 (30 %)
Shawville	7 ^e concession	1/9 (11 %)	6/54 (11 %)
Parc de la Gatineau	Ouest	3/9 (33 %)	4/54 (7 %)
Parc de la Gatineau	Eardley-Masham	1/11 (9 %)	1/54 (2 %)

La méthode de filtration avec une pompe a permis de détecter la présence d'ADNe de tortue mouchetée dans 5 des 6 sites à l'étude. Pour les 5 sites où l'ADNe a été détecté, le nombre de stations avec au moins une amplification positive varie entre 1 et 9. Le site de Shawville – Cycloparc dans le secteur est le seul site où l'ADNe de tortue mouchetée a été retrouvé à toutes les stations. C'est aussi au site du Cycloparc que le nombre d'amplifications positives totales est le plus grand (38/54, 70 %). Pour les autres sites, le nombre d'amplifications positives totales varie entre 1 et 13.

La méthode de filtration avec une seringue a permis de détecter la présence d'ADNe de tortue mouchetée pour l'ensemble des 4 sites à l'étude pour cette méthode. Pour ces sites, le nombre de stations avec au moins une amplification positive varie entre 1 et 4. Comme pour la méthode de filtration avec une pompe, c'est au site Cycloparc que le nombre de stations avec au moins une amplification positive (4/9) est le plus grand, tout comme le nombre d'amplifications positives totales (16/54, 30 %). Pour les autres sites, le nombre d'amplifications positives totales varie entre 1 et 6.

L'analyse par PCRq devait aussi être utilisée pour obtenir une quantification relative de l'ADNe de tortue mouchetée. Par contre, en raison du faible nombre d'amplifications positives, ce type d'analyse n'a pas pu être réalisé.

Discussion

Comparaison des méthodes

Afin d'évaluer l'efficacité des deux méthodes de filtration d'échantillons d'ADNe, nous avons comparé les amplifications obtenues pour chaque méthode avec le nombre de tortues mouchetées capturées par piégeage. Les résultats du nombre d'amplifications positives totales sont comparés à l'échelle du site aux figures 7 à 12. Le patron spatial des amplifications positives ne semble pas être lié à la position des tortues mouchetées capturées par piégeage. Comme les pièges ont été appâtés pour attirer les tortues, il n'était pas nécessairement attendu que le signal détecté par ADNe corresponde spatialement à celui détecté par piégeage. Par contre, on aurait pu détecter un signal plus fort dans certaines parties des milieux humides inventoriés, ce qui ne semble pas être le cas ici. On remarque également que le nombre d'amplifications positives à chaque station est généralement plus faible par la méthode de filtration avec seringue qu'avec pompe.

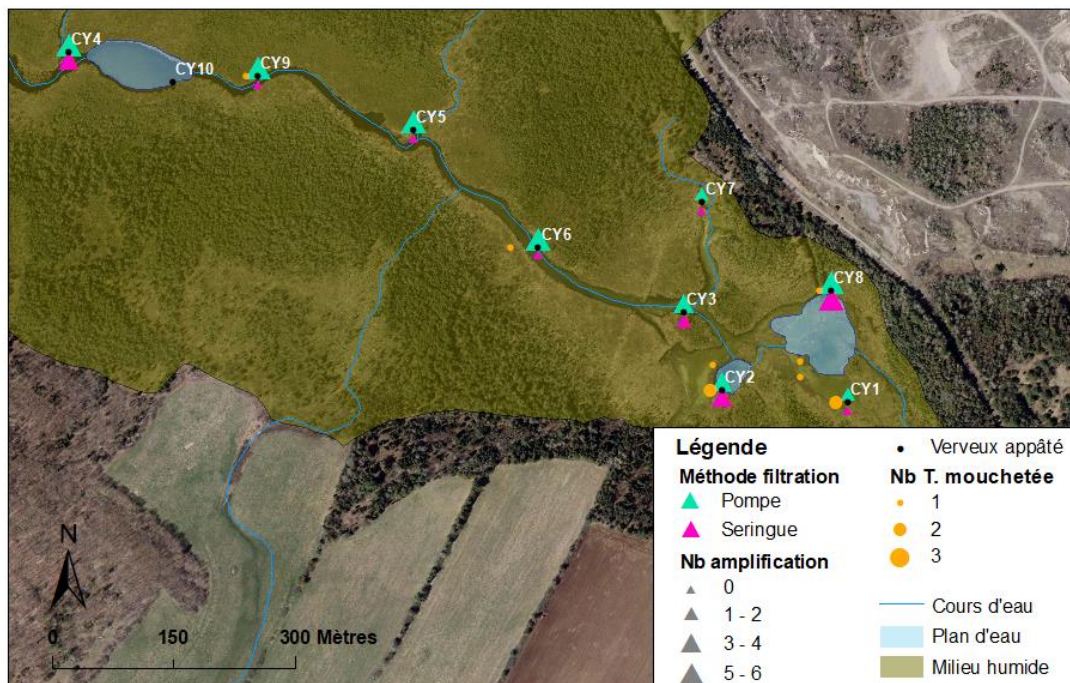


Figure 7. Détection de la tortue mouchetée par les méthodes d'ADN environnemental et de piégeage au site de Shawville – Cycloparc.

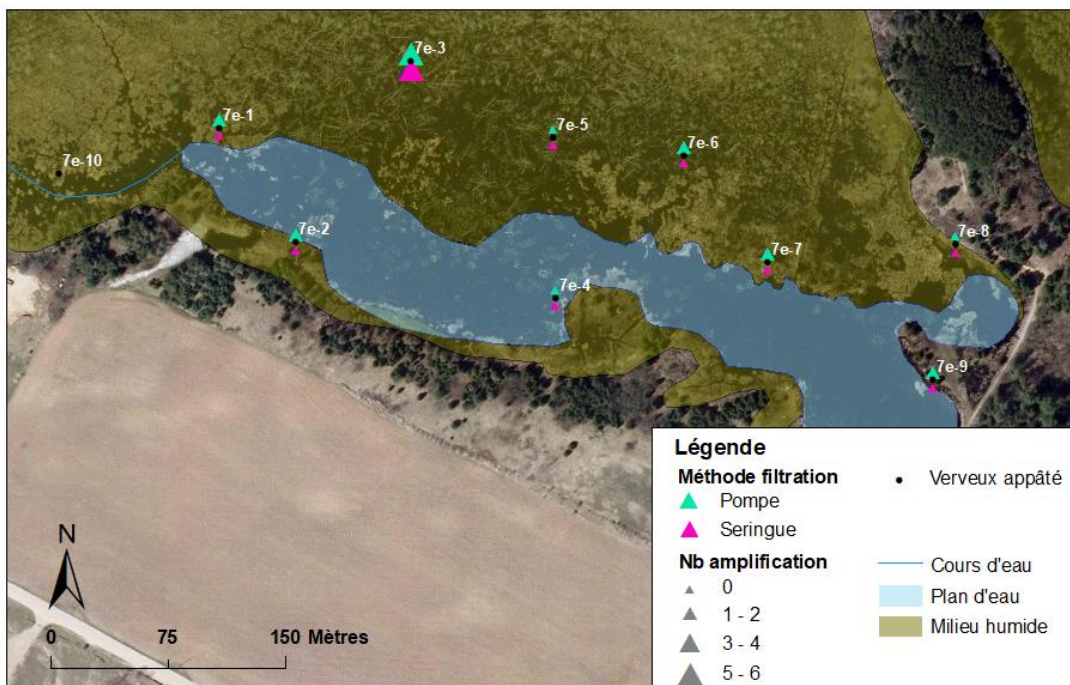


Figure 8. Détection de la tortue mouchetée par les méthodes d'ADN environnemental et de piégeage au site de Shawville – 7^e concession.

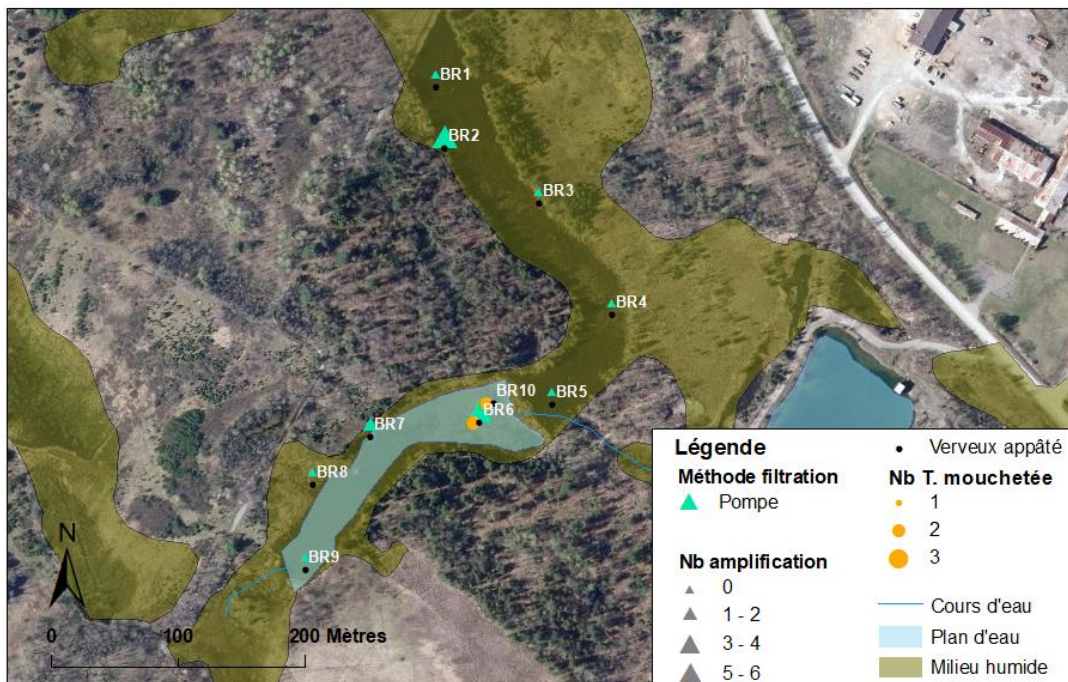


Figure 9. Détection de la tortue mouchetée par les méthodes d'ADN environnemental et de piégeage au site de Bristol – Chemin sans nom.

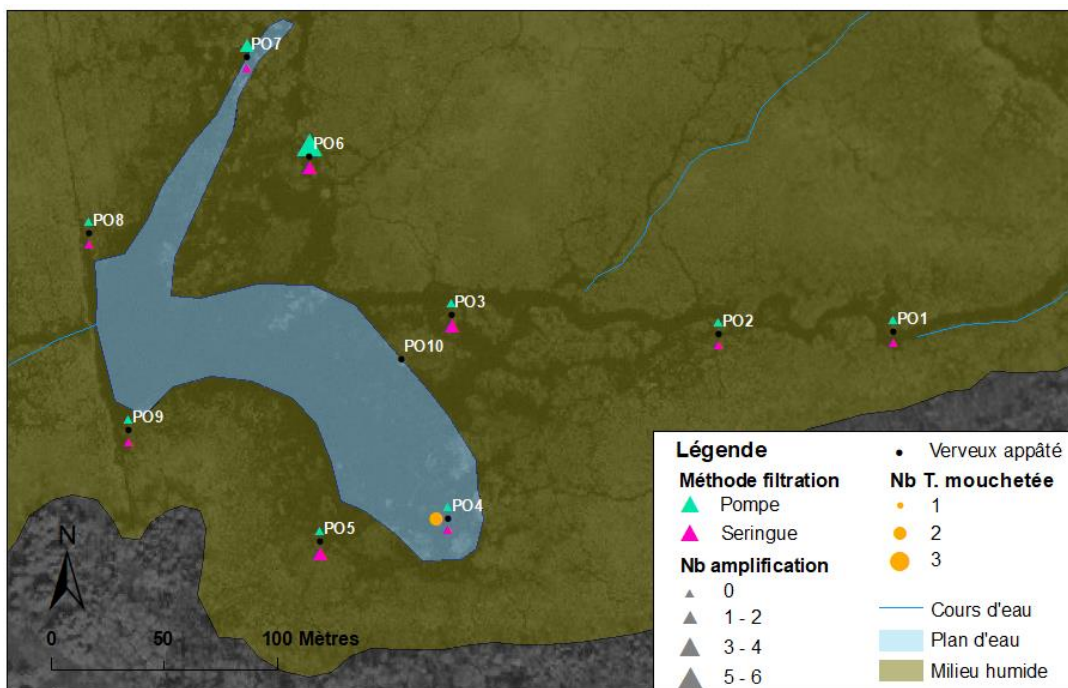


Figure 10. Détection de la tortue mouchetée par les méthodes d'ADN environnemental et de piégeage au site du parc de la Gatineau – Ouest.

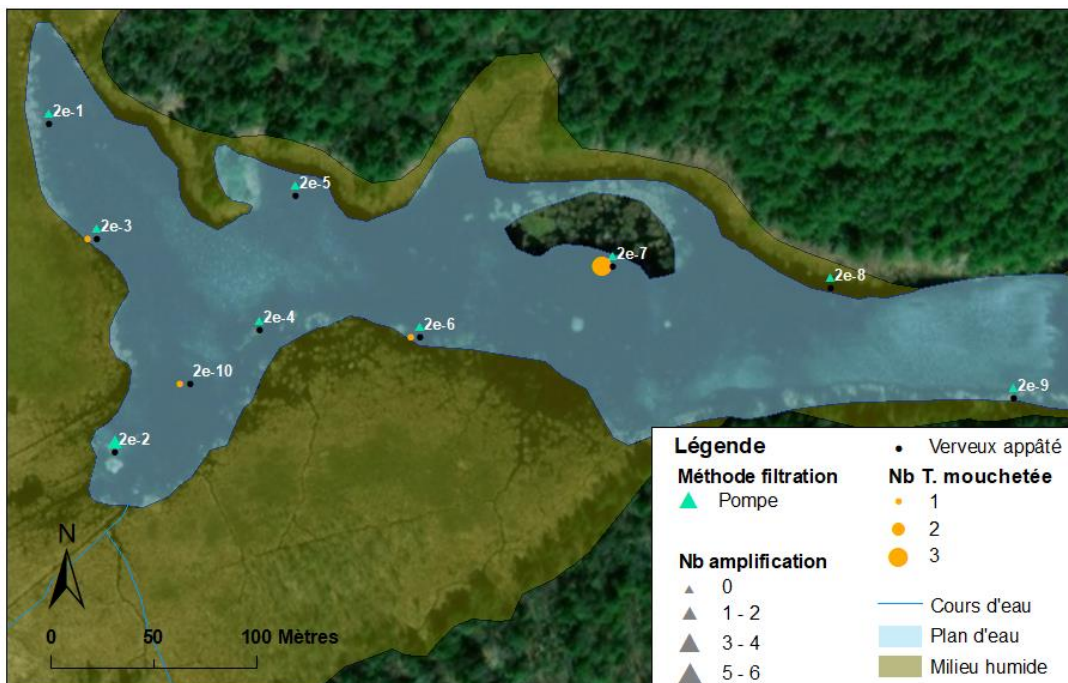


Figure 11. Détection de la tortue mouchetée par les méthodes d'ADN environnemental et de piégeage au site du parc de la Gatineau – Milieu 2.

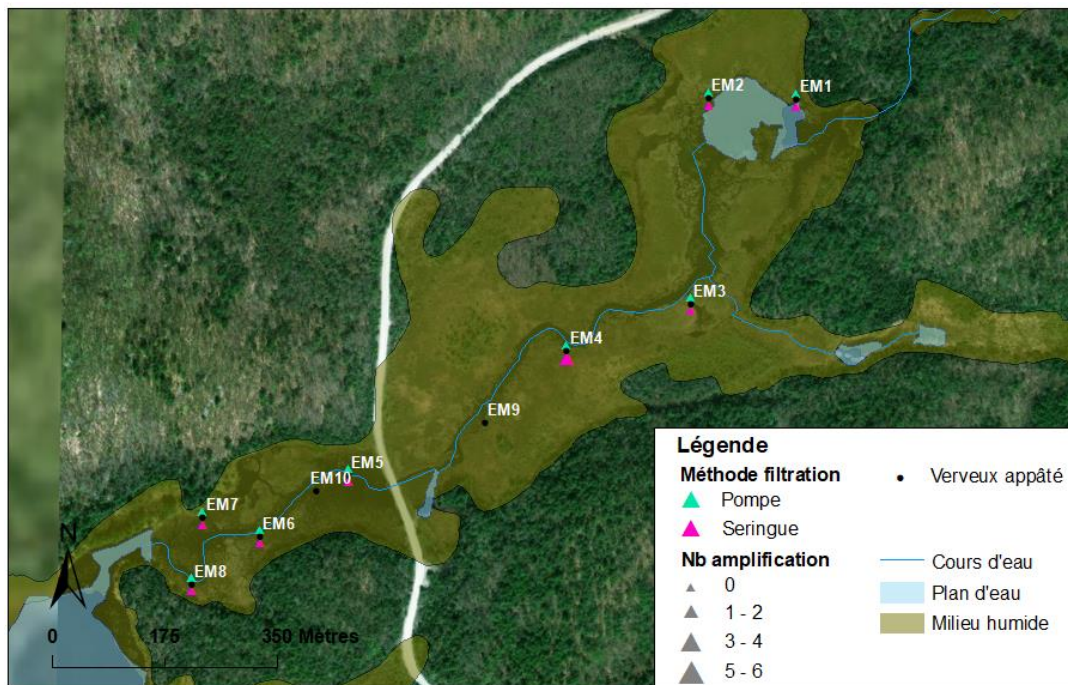


Figure 12. Détection de la tortue mouchetée par les méthodes d'ADN environnemental et de piégeage au site du parc de la Gatineau – Eardley-Masham.

Les deux méthodes de filtration des échantillons d'ADNe ont également été comparées à la capture par piégeage pour l'ensemble des sites. Les figures 13 et 14 montrent le taux de détection de la tortue mouchetée pour chacune des méthodes. Les résultats sont présentés séparément pour les stations avec au moins une amplification positive (9 stations/site) et pour le total des amplifications positives par site (54 réplicats/site; 9 stations x 6 réplicats).

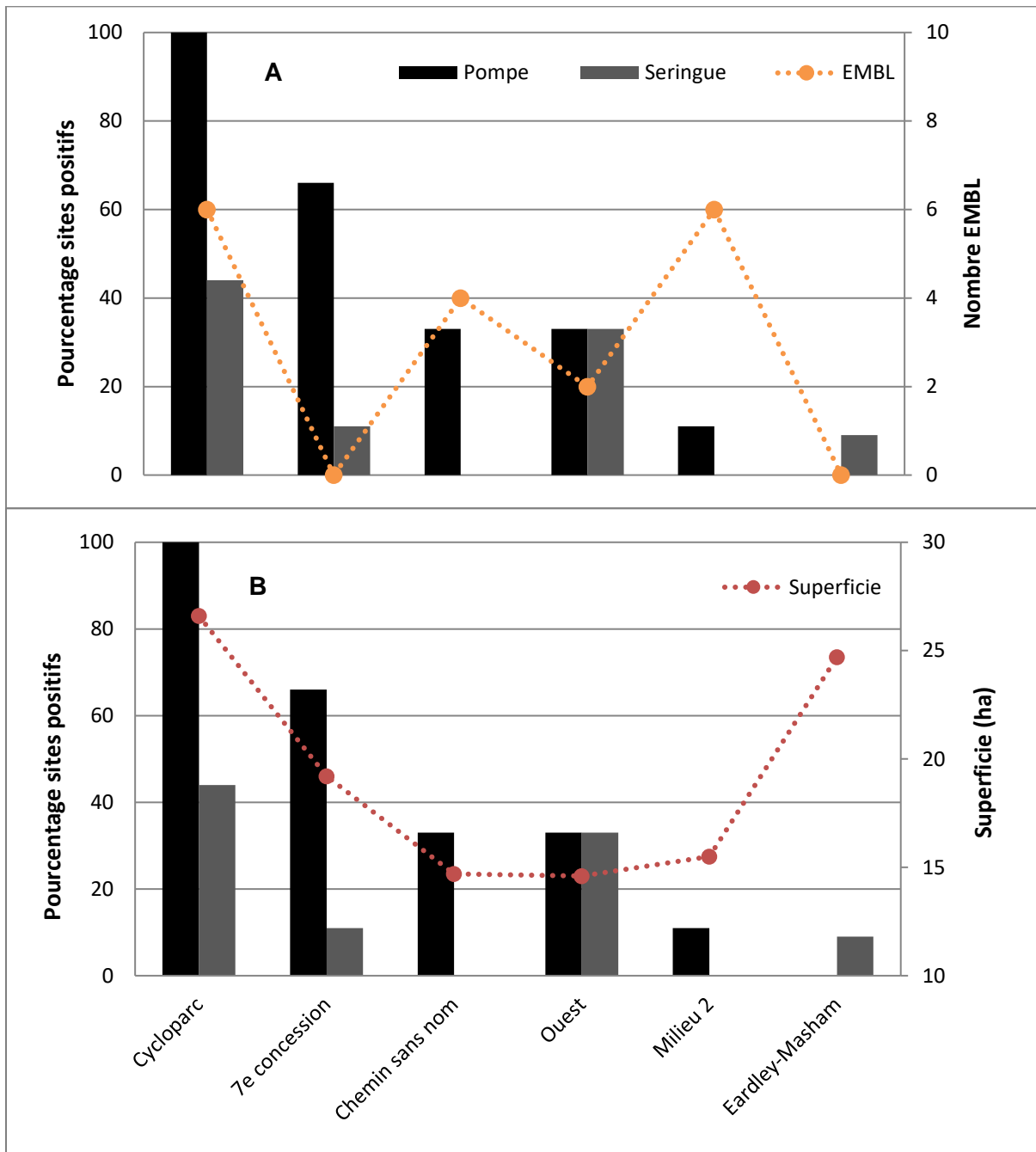


Figure 13. Comparaison du pourcentage de stations ($n = 9$ à chaque site) auxquelles la tortue mouchetée (EMBL) a été détectée par la méthode d'ADN environnemental avec A) le nombre de tortues mouchetées détectées par piégeage et B) la superficie inventoriée par piégeage.

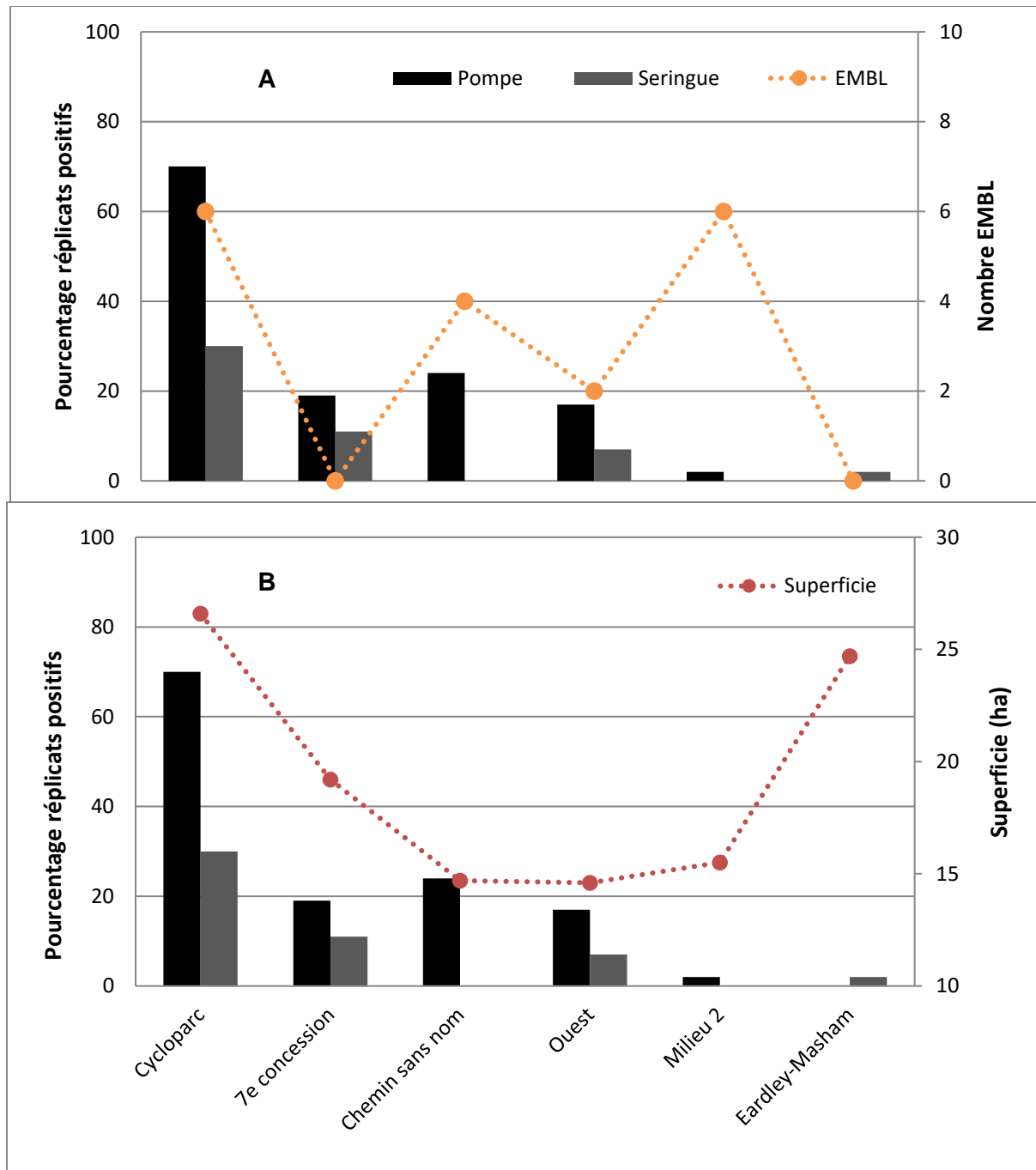


Figure 14. Comparaison du pourcentage de réplicats ($n = 54$ à chaque site) dans lesquels la tortue mouchetée (EMBL) a été détectée par la méthode d'ADN environnemental avec A) le nombre de tortues mouchetées détectées par piégeage et B) la superficie inventoriée par piégeage.

Pour les deux méthodes de filtration des échantillons d'ADNe, l'ADN de tortue mouchetée a été détecté pour l'ensemble des sites échantillonnés, à l'exception du site d'Eardley-Masham. À ce site où aucune capture par piégeage n'a été réalisée, la tortue mouchetée a été détectée seulement par la méthode d'ADNe avec filtration par seringue. La méthode de filtration avec une pompe apparaît plus efficace que la filtration avec une seringue, car le taux de détection était supérieur pour les sites avec au moins une amplification positive (une station) ainsi que pour les amplifications positives totales à chaque site.

La différence observée peut être attribuable au volume d'eau filtré. En effet, le volume d'eau pour la méthode de filtration avec pompe est quatre fois plus grand que pour la méthode avec seringue (1 L versus 250 mL). Le taux de détection de l'ADN de la tortue mouchetée est somme toute faible pour les deux méthodes de filtration lorsqu'on considère les amplifications positives totales.

Le taux de détection de l'ADN de la tortue mouchetée pour les deux méthodes de filtration ne semble pas lié à sa détection par la méthode traditionnelle de piégeage. Le taux de détection de l'ADN de la tortue mouchetée pour les amplifications positives totales (méthode semi-quantitative) ne peut donc pas être utilisé pour estimer l'abondance de tortues mouchetées dans cette étude (Lacoursière-Roussel et coll., 2016). Le nombre d'amplifications positives était également trop faible pour utiliser la PCRq dans cette étude. Le nombre de tortues mouchetées détectées par ADNe et par piégeage est faible pour la plupart des sites, ce qui rend la comparaison des méthodes difficile. Des recommandations sont données à la section suivante en vue de mettre en place un protocole d'échantillonnage qui tient compte du faible taux de détection de l'espèce en Outaouais.

Le nombre de tortues mouchetées capturées à chaque site ne semble pas non plus être relié à la surface inventoriée. Cela pourrait suggérer que la surface inventoriée variait trop peu pour pouvoir observer une différence. Cela peut également indiquer qu'au-delà d'un certain seuil, les caractéristiques d'un milieu (profondeur, végétation, etc.) sont plus importantes que sa taille dans la sélection d'habitats chez la tortue mouchetée.

Tous les sites inventoriés dans cette étude sont reconnus pour être occupés par la tortue mouchetée, bien que la tortue mouchetée n'ait pas été capturée à tous les sites (Dubois et coll., 2012). On peut donc supposer que la méthode d'ADNe permet une détection de type présence/absence pour l'espèce demandant moins d'effort d'inventaire terrain. Par contre, la méthodologie utilisée ne permet pas d'estimer l'abondance de l'espèce, ni par piégeage ni par ADNe.

Recommandations

L'inventaire de tortues mouchetées de 2016 n'a pas permis de déterminer si la méthode d'ADNe peut être utilisée comme outil de suivi de l'abondance des populations. La méthode d'échantillonnage pourrait être améliorée afin de mieux évaluer le lien entre l'abondance estimée par ADNe et celle estimée par piégeage. Les recommandations suivantes visent la mise en place d'un protocole d'inventaire qui permettrait de répondre à ce besoin.

1. Augmenter l'effort de piégeage :

Le taux de détection de la tortue mouchetée par piégeage est plutôt faible. Une augmentation de l'effort de piégeage (nombre de jours-pièges déployés) permettrait d'obtenir une estimation de l'abondance plus fiable pour cette méthode et, par le fait même, plus facile à comparer avec l'abondance estimée par la méthode d'ADNe. L'effort de piégeage peut être accru en augmentant la densité de pièges sur la surface inventoriée ou en augmentant la durée de la session de piégeage à un site. On peut se référer à Dubois et coll. (2011) pour déterminer le nombre de jours-pièges nécessaires pour les secteurs inventoriés en Outaouais. Comparer la densité de pièges utilisés en Outaouais avec d'autres études canadiennes et le protocole de Jones et coll. (2012) permettrait également d'ajuster le nombre de pièges en fonction de la taille des milieux humides choisis. Une plus longue durée de piégeage pourrait également compenser un faible taux de détection en augmentant les probabilités que les tortues se déplacent à proximité des pièges.

2. Optimiser la période de piégeage :

La méthode de piégeage peut être utilisée pour capturer des tortues mouchetées dès l'émergence de l'hibernation en avril jusqu'à la fin de la saison active en novembre (Dubois et coll., 2012). Cependant, certaines périodes durant la saison active pourraient s'avérer plus propices à la capture avec des verveux appâtés. Par exemple, l'intérêt des tortues pour l'appât peut varier en fonction de la température ambiante (digestion inhibée à des températures froides), de la quantité de nourriture disponible dans l'environnement (plus abondante en été) et de leur cycle de vie (périodes de reproduction, de ponte, de déplacements et d'estivation). Les tortues utilisent également des habitats différents selon la période, ce qui peut causer des variations sur le taux de détection au cours de la saison active. Il est donc pertinent d'évaluer l'abondance par piégeage à différentes périodes durant la saison active.

3. Augmenter le nombre de stations d'échantillonnage par ADNe :

Il n'a pas été possible d'utiliser la PCRq en raison du trop faible nombre d'amplifications positives. Afin d'augmenter la probabilité de détecter l'ADN de la tortue mouchetée, il serait possible d'ajouter des stations d'échantillonnage à chaque milieu inventorié. Cela permettrait d'obtenir un portrait plus représentatif de la présence d'ADNe dans les milieux inventoriés.

4. Optimiser la méthode de filtration :

Comme il en a été discuté à la section précédente, la filtration d'un plus grand volume d'eau a entraîné une meilleure détection de l'ADN de la tortue mouchetée dans les échantillons d'eau. Il serait donc pertinent d'utiliser une méthode de filtration qui permet le traitement d'échantillons de 1 L et plus. En raison des contraintes de transport des échantillons, il serait plus efficace de pouvoir filtrer l'eau directement sur le terrain. Le ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs a développé une méthode de filtration par pompe pouvant être utilisée sur le terrain. Le Ministère a également adopté l'utilisation d'un pré-filtre qui permet de retirer les matières en suspension dans les échantillons, en laissant passer l'ADN, ce qui permet aussi le traitement de plus grands volumes d'eau avec les filtres. Ces nouvelles méthodes font partie des protocoles publiés par le Ministère qui sont présentés dans la section Avant-propos.

Conclusion

Cette étude aura permis de réaliser une première évaluation du potentiel de l'ADNe pour l'inventaire et le suivi des populations de la tortue mouchetée au Québec. Les résultats obtenus indiquent que l'ADNe constitue une méthode efficace pour détecter la présence de l'espèce dans un milieu humide occupé par l'espèce. Toutefois, les indicateurs d'abondance relative obtenus avec les deux techniques de filtration d'ADNe et la méthode traditionnelle de capture à l'aide de pièges ne montraient aucune corrélation, contrairement aux résultats obtenus pour la tortue des bois (Lacoursière et coll., 2016). Il est proposé d'augmenter l'effort d'échantillonnage à la fois pour la méthode traditionnelle de capture et pour l'ADNe, afin d'obtenir un indice d'abondance relative plus précis pour chacune des méthodes. Une amélioration des techniques de filtration pour la récolte des échantillons d'eau pourrait également contribuer à obtenir de meilleurs résultats d'analyses de l'ADNe. Cette amélioration pourrait mener vers une meilleure corrélation entre les indices d'abondance relative obtenus par la capture et par l'ADNe.

Les recommandations formulées à la suite de cette première étude effectuée en 2016 ont contribué à peaufiner les méthodes d'utilisation de l'ADNe dans le cadre d'inventaires fauniques. Celles-ci font maintenant partie des protocoles standardisés du Ministère concernés par le recours à l'ADNe pour inventorier les tortues d'eau douce, à savoir le *Protocole standardisé pour l'inventaire des tortues d'eau douce à l'aide de l'ADNe au Québec* (MFFP, 2022) et le *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* (MFFP, 2021). Par ailleurs, ces recommandations ont également été mises en application dans un second projet de recherche qui était en cours de réalisation au moment de la rédaction du présent rapport. Ce projet, mené conjointement par l'Université du Québec en Outaouais, le MFFP et Environnement et Changement climatique Canada, vise à poursuivre l'évaluation du potentiel de la méthode d'ADNe pour suivre la tendance des populations de la tortue mouchetée au Québec.

Références

- APRIL, J., R.L. MAYDEN, R. HANNER et L. BERNATCHEZ (2011). "Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(26):10603–10607.
- DEINER, K., J.-C. WALSER, E. MÄCHLER et F. ALTERMATT (2015). "Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA", *Biological Conservation*, 183:53–63.
- DUBOIS, Y., G. FORTIN et S. PELLETIER (2012). *Cartographie des habitats essentiels et identification des menaces au maintien des populations de tortues mouchetées dans le parc de la Gatineau et les aires prioritaires de conservation de l'espèce en périphérie du Parc – Rapport final suite aux trois années des travaux de terrain (2009-2011)*. Conservation de la nature Canada, pour la Commission de la capitale nationale. 71 p. + 7 annexes.
- DUBOIS, Y., O. ORJIKH et S. PELLETIER (2011). *Cartographie des habitats essentiels et identification des menaces au maintien des populations de tortues mouchetées dans le parc de la Gatineau et les aires prioritaires de conservation de l'espèce en périphérie du Parc – phase II, 2^e rapport d'étape – Résultats préliminaires suite à la seconde année des travaux de terrain*. Conservation de la nature Canada, pour la Commission de la capitale nationale. 31 p. + 6 annexes.
- ENVIRONNEMENT CANADA (2016). *Programme de rétablissement de la tortue mouchetée (Emydoidea blandingii), population des Grands Lacs et du Saint-Laurent, au Canada [Proposition]*. Série de Programmes de rétablissement de la Loi sur les espèces en péril. Environnement Canada, Ottawa. viii + 55 p.
- ÉQUIPE DE RÉTABLISSEMENT DES TORTUES DU QUÉBEC (2020). *Plan de rétablissement de la tortue mouchetée (Emydoidea blandingii) au Québec — 2020-2030*, produit pour le ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, Direction générale de la gestion de la faune et des habitats, 52 p.
- FORTIN, G., G. BLOUIN-DEMERS et Y. DUBOIS (2012). "Landscape composition weakly affects home range size in Blanding's turtles (*Emydoidea blandingii*)", *Ecoscience*, 19(3):191-197.
- GOLDBERG, C.S., D.S. PILLIOD, R.S. ARKLE et L.P. WAITS (2011). "Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders", *PloS ONE*, 6(7): e22746.
- HEBERT, P.D.N., A. CYWINSKA A, S.L. BALL et J.R. DEWAARD (2003). "Biological identifications through DNA barcodes", *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences*, 270: 313-321.

- JONES, M.T., L.L. WILLEY, T.S.B. AKRE, C. CASTELLANO et P. R. SIEVERT (2012). *Draft Coordinated monitoring Strategy for Blanding's Turtle (Emydoidea blandingii) in the North-eastern United States*. Massachusetts Cooperative Fish and Wildlife Research Unit, Northeast Blanding's Turtle Working Group, Amherst, Massachusetts, 11 p.
- LACOURSIÈRE-ROUSSEL, A., Y. DUBOIS, E. NORMANDEAU et L. BERNATCHEZ (2016). "Improving herpetological surveys in eastern North America using the environmental DNA method", *Genome*, 59: 991–1007.
- MFFP (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.
- MFFP (2022). *Protocole standardisé pour l'inventaire des tortues d'eau douce à l'aide de l'ADNe au Québec*, gouvernement du Québec, Québec. 39 p. + annexes.
- RENSHAW, M.A., B.P. OLDS, C.L. JERDE, M.M. MCVEIGH et D.M. LODGE (2014). "The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction", *Molecular Ecology Resources*, 15:168-176
- TAMURA, K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI et S. KUMAR (2013). "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729
- WILCOX, T.M., K.S. MCKELVEY, M.K. YOUNG, S.F. JANE, W.H. LOWE, A.R. WHITELEY et M.K. SCHWARTZ (2013). "Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity", *PLoS ONE*, 8(3): e59520.

Annexe 1 – Protocole d'extraction d'ADN pour la méthode de filtration avec pompe péristaltique ou pompe vacuum

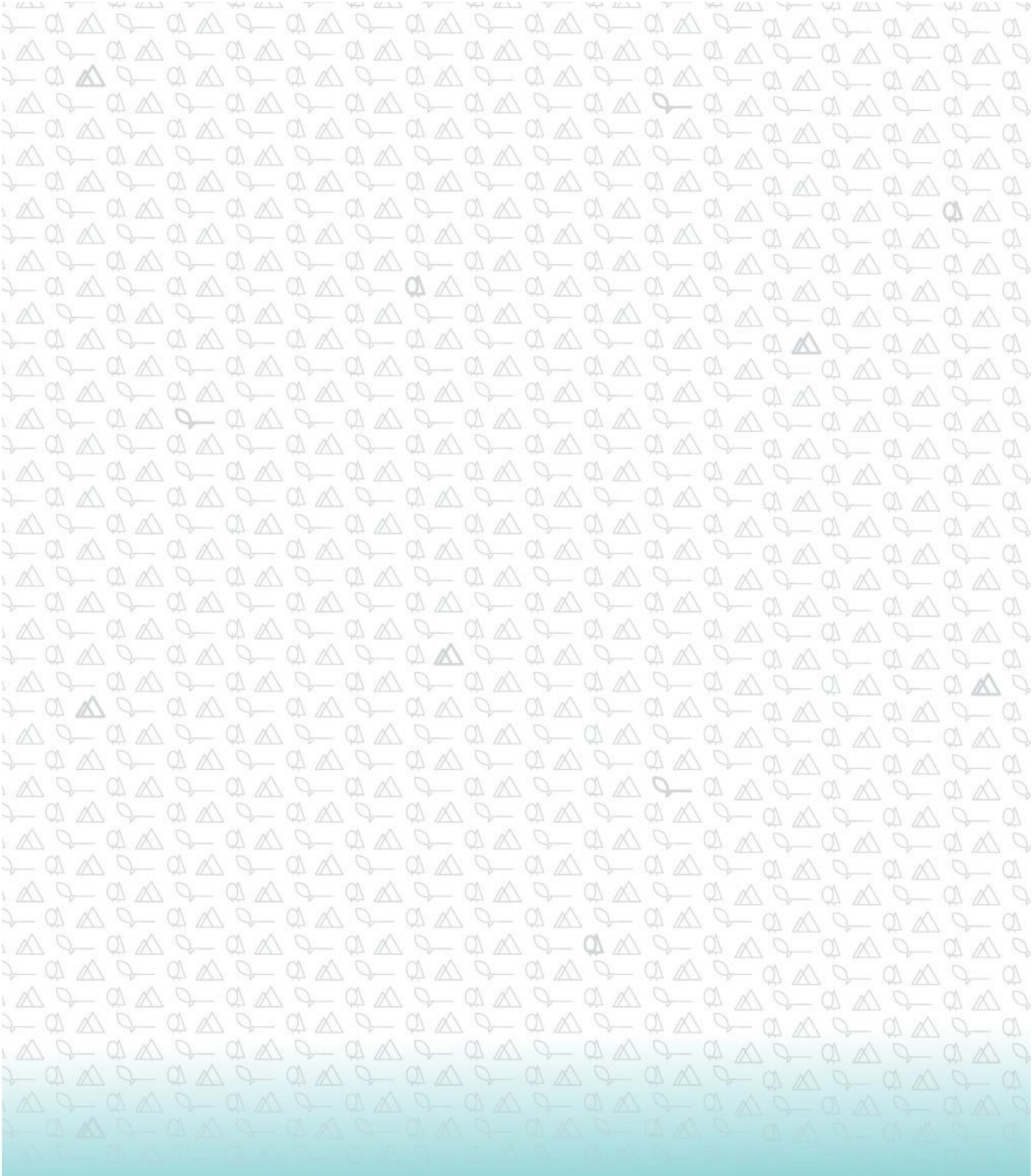
Extraction

1. Couper une moitié de filtre et la mettre dans un tube 1,5 mL.
2. Ajouter 450 µl de Buffer ATL.
3. Ajouter 50 µl de protéinase K, mélanger doucement en utilisant un agitateur-mélangeur vortex, et incubé à 56 °C, à vitesse 300 toute la nuit.
4. Mélanger doucement en utilisant un agitateur-mélangeur vortex pendant 15 s.
5. Mettre le tout (filtre et liquide) dans un tube QIAshredder et centrifuger pendant 3 minutes à 13 000 rpm. Le faire plusieurs fois jusqu'à ce que le tout soit centrifugé.
6. Enlever et jeter la colonne de filtration.
7. Mettre 400 µl du liquide récolté dans un autre tube de 2 mL préidentifié. Le liquide est alors divisé en deux.
8. Pour chaque tube, ajouter 400 µl de Buffer AL, mélanger doucement en utilisant un agitateur mélangeur vortex et incubé (bain-marie) à 70 °C pendant 10 minutes.
9. Pour chaque tube, ajouter 400 µl d'Éthanol (96-100 %) et mélanger doucement en utilisant un agitateur mélangeur vortex.
10. Transférer le contenu des deux tubes dans un DNeasy Mini spin column placé dans un tube collecteur de 2 mL et centrifuger à 13 000 rpm pendant 1 min (le faire en plusieurs fois). Jeter le liquide et le tube collecteur et garder la colonne de filtration.
11. Transférer la colonne de filtration dans un nouveau tube collecteur de 2 mL. Ajouter 500 µl de Buffer AW1. Centrifuger à 13 000 rpm pendant 1 min. Jeter le liquide et le tube collecteur et garder la colonne de filtration.
12. Transférer la colonne de filtration dans un nouveau tube collecteur de 2 mL. Ajouter 500 µl de Buffer AW2. Centrifuger à 13 000 rpm pendant 3 min. Jeter le liquide et le tube collecteur et garder la colonne de filtration.
13. Transférer la colonne de filtration dans un nouveau tube collecteur de 2 mL préidentifié.
14. Éluer l'ADN en ajoutant 20 µl d'eau (Nuclease-Free Water) au centre de la membrane de la colonne de filtration. Incuber à température ambiante (15–25 °C) pendant 5 min et centrifuger à 13 000 rpm pendant 1 min.
15. Répéter l'étape 13 pour un total de 40 µl.
16. Transférer le spin column dans un nouveau tube préidentifié.
17. Transférer la colonne de filtration dans un nouveau tube préidentifié.
18. Éluer l'ADN en ajoutant 40 µl d'eau (Nuclease-Free Water) au centre de la membrane de la colonne de filtration. Incuber à température ambiante (15–25 °C) pendant 5 min et centrifuger à 13 000 rpm pendant 1 min.
19. Jeter la colonne de filtration et mettre au congélateur à -20 °C.

Annexe 2 – Protocole d'extraction d'ADN pour la méthode de filtration avec seringue

Extraction

1. Ajouter 30 µL de Protéinase K (4 mg/mL) à chaque échantillon et mélanger doucement en utilisant un agitateur mélangeur vortex.
2. Incuber durant une nuit à 55 °C; ne pas dépasser 22 heures dans l'incubateur.
3. Extraire le liquide du filtre en appuyant sur le filtre à l'aide de la pointe d'une pipette sur le côté du tube.
4. Pipetter le liquide dans un nouveau tube 950 µl.
5. Ajouter un volume égal de PCI (phénol chloroforme alcool isoamylique) représentant 950 µl si possible. PCI a deux couches, retirer le PCI à partir de la couche inférieure (phase organique).
6. Agiter pendant 5 minutes.
7. Centrifuger les échantillons pendant 5 min à 10 000 rpm.
8. Pipetter le surnageant dans un nouveau tube.
9. Ajouter 780 µl de CI dans chaque tube.
10. Agiter pendant 5 minutes.
11. Centrifuger les échantillons pendant 5 min à 10 000 rpm.
12. Pipetter le surnageant et le placer dans une nouvelle série de tubes de microcentrifugation.
13. Ajouter 375 µl de NaCl 5M à chaque tube.
14. Ajouter 750 µl (volumes égaux) de 100 % isopropanol gardé au congélateur à chaque tube.
15. Congeler à -20 °C pendant la nuit.
16. Placer de l'eau dans un incubateur (55 °C); en préparation pour l'élution à l'étape 26.
17. Centrifuger les échantillons pendant 20 min à 13 000 rpm.
18. Décanter l'isopropanol en faisant attention de ne pas perdre le culot (peut ne pas être visible).
19. Ajouter 1500 µl d'éthanol 70 % congelé (ce qui est deux volumes égaux).
20. Centrifuger 20 min à 13 000 rpm.
21. Retirer l'éthanol; attention de ne pas perdre le culot, mais enlever le maximum d'éthanol.
22. Sécher les tubes à l'air avec le couvercle ouvert dans une hotte laminaire pendant 15 min pour permettre à l'éthanol de s'évaporer.
23. Resuspendre l'ADN dans 100 µl d'eau (préparé à l'étape 19).
24. Placer le tube dans un incubateur à 55 °C pendant 10 min pour dissoudre l'ADN.
25. Entreposer les échantillons à -20 °C.



**Forêts, Faune
et Parcs**

Québec 