



## **LOUTRE FICHE N°2**

# **PROTOCOLE DE RECOLTE DE MATERIEL GENETIQUE**

Les techniques de biologie moléculaire permettent d'utiliser des indices de présence comme des poils ou des épreintes comme source d'ADN. Selon la quantité de matériel disponible, l'identification des individus selon leur génotype permettra d'étudier les mouvements individuels, les limites de territoires, l'estimation de la taille des populations, mais aussi les relations de parenté entre individus et l'histoire récente ou plus ancienne de ces populations...

A savoir : une collecte bien faite donne des résultats exploitables à plus de 80%, alors que dans de mauvaises conditions, ils peuvent n'être que de 20% !

### **Travail du coordinateur départemental**

Le coordinateur départemental récupère le matériel de récolte et de stockage des épreintes auprès du CORA Faune Sauvage et le distribue aux personnes bénévoles et/ou salariées qui prospectent dans son département. Il s'assure que ce protocole est bien connu et que les participants ont conscience de l'importance du respect du protocole.

Le coordinateur départemental organise les prospections en fonction des besoins suivants (2009/2010 et 2010/2011) :

Département	<i>a minima</i>	Nombre d'épreintes
Ain	Rivière d'Ain, confluence avec le Rhône	au moins 15
Drôme	Selon résultats de prospection	au moins 5
Isère	Selon résultats de prospection	au moins 5
Rhône	Selon résultats de prospection	au moins 5
Savoie	Selon résultats de prospection	au moins 5
Haute-Savoie	Selon résultats de prospection	au moins 15
Loire	Bassin versant du fleuve Loire	au moins 30
Ardèche	Bassin versant de la Cèze	entre 30 et 50
	Bassin versant de l'Ardèche	entre 30 et 50
	Bassin versant de l'Eyrieux	entre 30 et 50

A la fin de chaque période de prospection, le coordinateur départemental participe à l'organisation de l'acheminement dans de bonnes conditions de l'ensemble du matériel génétique récolté, vers un point central (à définir par le CORA FS et l'Université partenaire).

### **Protocole de terrain**

#### **Matériel (par personne) :**

Sur le terrain :

5 à 10 petits tubes remplis de gel Silica, munis d'une étiquette pour la collecte et la conservation

1 Feutre indélébile

Dans la voiture :

1 Glacière contenant des pains réfrigérés

A la maison :

1 Congélateur (-18 à -20 °C)

## Méthode :

### Où et quand chercher les épreintes ?

La période la plus favorable pour la collecte se situe **entre mi-septembre et mai**.

Les lieux les plus favorables pour trouver les épreintes sont les passages sous les ponts, les seuils, les confluences et tout rocher, arbre, objet insolite, qui marque le linéaire de la rivière.

### Comment récolter une épreinte ?

Une fois trouvée, l'épreinte (avec le mucus qui l'entoure) doit être poussée délicatement avec un bout de bois **dans un tube rempli d'un dessiccateur** (Gel Silica). Ce tube est fourni (bien fermé pour garantir l'étanchéité).

Il faut impérativement changer de bout de bois entre deux échantillons afin de ne pas échanger de matériel (cellules ou ADN) entre les échantillons, ce qui compromettrait les analyses génétiques.

Inscrire sur le tube des renseignements qui permettront d'identifier sans ambiguïtés l'échantillon collecté. Le minimum est donc la date de collecte, l'observateur, le site (coordonnées X,Y ou numéro) et un numéro d'observation, de Obs\_1 à Obs\_n. On recommence la numérotation à 1 si on change de date de collecte, de lieu ou d'observateur.

Des observations telles que l'état de fraîcheur de l'épreinte et les conditions de température et d'ensoleillement lors de la récolte, peuvent être ajoutées sur le tube ou sur une feuille d'observation à joindre aux échantillons.

### Ce qu'il faut savoir :

- L'ADN est dégradé par l'action conjointe des UV et de l'humidité et par des microorganismes, et cette dégradation est d'autant plus rapide que la température est élevée. Il est donc fortement recommandé de récolter les épreintes par temps froid et sec si possible et de placer les échantillons au froid (glacière + bloc congélateur) le plus rapidement possible.

- Le même protocole est applicable pour la récolte des gelées utilisées pour le marquage du territoire.

- Il n'est pas nécessaire de prendre toutes les épreintes d'un site, les loutres en ont besoin malgré tout ! Des prélèvements sur un grand linéaire permettent d'analyser plus justement la population de la rivière.

### Comment conserver les échantillons ?

#### EPREINTES

Une fois rentré de mission, il faut congeler les échantillons (-18 à -20°C) afin de limiter la dégradation de l'ADN. Le temps de ramener les tubes avec les épreintes jusqu'au congélateur, le gel Silica a le temps de faire effet (il capte l'eau pour éviter l'éclatement des cellules à la congélation). Toutefois si le gel a viré au blanc (saturation en humidité), il est préférable de transférer l'épreinte dans un nouveau tube (sur lequel il faut aussi transférer les informations !) et attendre 2-3 heures avant de les congeler. Il est important de noter sur le tube si ce genre d'opération a été effectué.

#### POILS

Les poils trouvés doivent être stockés dans des enveloppes en papier à température ambiante ou dans des tubes remplis de dessiccateur (Gel Silica) et congelés à -20°C.

Avant de mettre les échantillons au congélateur, il est recommandé de vérifier que toutes les informations sont notées sur le tube.

#### CADAVRES

Ils doivent être congelés pour des raisons de confort...

Bien conserver les informations liées au cadavre sur une fiche référencée.

#### TISSUS

Stocker les échantillons de tissus musculaires dans l'éthanol 100 % à température ambiante et à l'abri de la lumière.

### Comment restituer les échantillons pour analyse ?

Il est très important de **ne pas congeler/décongeler les échantillons** ce qui est particulièrement destructeur pour l'ADN.

Les échantillons sont décongelés lors d'un ramassage chez les observateurs ou lors de leur envoi par la Poste (Chronopost) à une date décidée en avance par la coordinateur régional. Tout délai entre la date de réception (=décongélation) et la date d'analyse des échantillons diminue les chances de succès.