



Pêches et Océans
Canada

Fisheries and Oceans
Canada

Sciences des écosystèmes
et des océans

Ecosystems and
Oceans Science

Secrétariat canadien de consultation scientifique (SCCS)

Document de recherche 2021/019

Région de la capitale nationale

Lignes directrices sur l'utilisation des analyses ciblées d'ADN environnemental (ADNe) pour la gestion des espèces aquatiques envahissantes et des espèces en péril

Cathryn Abbott^{1*}, Mark Coulson^{2*}, Nellie Gagné^{3*}, Anaïs Lacoursière-Roussel^{4*}, Geneviève J. Parent^{5*}, Robert Bajno⁶, Charise Dietrich², et Shannan May-McNally²

Pêches et Océans Canada

¹ Station biologique du Pacifique,
3190, chemin Hammond Bay, Nanaimo (Colombie-Britannique) V9T 6N7

² Région de la capitale nationale, Sciences des écosystèmes et des océans,
200, rue Kent, Ottawa (Ontario) K1A 0E6

³ Centre des pêches du Golfe,
343, avenue University, Moncton (Nouveau-Brunswick) E1C 9B6

⁴ Station biologique de St. Andrews,
125, promenade Marine Science, St. Andrews (Nouveau-Brunswick) E5B 0E4

⁵ Institut Maurice-Lamontagne,
850, route de la Mer, Mont-Joli (Québec) G5H 3Z4

⁶ Institut des eaux douces,
501, croissant University, Winnipeg (Manitoba) R3T 2N6

*Ces auteurs ont contribué de manière égale à ce travail.

Avant-propos

La présente série documente les fondements scientifiques des évaluations des ressources et des écosystèmes aquatiques du Canada. Elle traite des problèmes courants selon les échéanciers dictés. Les documents qu'elle contient ne doivent pas être considérés comme des énoncés définitifs sur les sujets traités, mais plutôt comme des rapports d'étape sur les études en cours.

Publié par :

Pêches et Océans Canada
Secrétariat canadien de consultation scientifique
200, rue Kent
Ottawa (Ontario) K1A 0E6

[http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/
csas-sccs@dfo-mpo.gc.ca](http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/csas-sccs@dfo-mpo.gc.ca)



© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, 2021
ISSN 2292-4272

La présente publication doit être citée comme suit :

Abbott, C., Coulson, M., Gagné, N., Lacoursière-Roussel, A., Parent, G.J., Bajno, R., Dietrich, C., May-McNally, S. 2021. Lignes directrices sur l'utilisation des analyses ciblées d'ADN environnemental (ADNe) pour la gestion des espèces aquatiques envahissantes et des espèces en péril. Secr. can. de consult. sci. du MPO. Doc. de rech. 2021/019. iv + 46 p.

Also available in English :

Abbott, C., Coulson, M., Gagné, N., Lacoursière-Roussel, A., Parent, G.J., Bajno, R., Dietrich, C., May-McNally, S. 2021. Guidance on the Use of Targeted Environmental DNA (eDNA) Analysis for the Management of Aquatic Invasive Species and Species at Risk. DFO Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc. 2021/019. iv + 42 p.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	IV
INTRODUCTION	1
OBJET DU PRÉSENT DOCUMENT	3
RÉSUMÉ DU CONTENU ET DES INSTRUCTIONS.....	4
SECTION I : ANALYSE D'ADNE – RENSEIGNEMENTS RELATIFS À LA SOUMISSION DES ÉCHANTILLONS.....	6
SECTION II : PLAN D'ÉTUDE ET ÉCHANTILLONNAGE DE L'ADNE	6
A. Information sur l'étude.....	8
B. Plan d'étude.....	9
C. Prélèvement des échantillons d'ADNe	14
SECTION III : ANALYSE DES ÉCHANTILLONS D'ADNE – MÉTHODES DE LABORATOIRE	16
D. Extraction de l'ADN.....	19
E. Test qPCR	20
SECTION IV : SOMMAIRE DES RÉSULTATS D'ADNE.....	25
F. Présentation des résultats des témoins.....	26
G. Présentation des résultats d'ADNe	26
H. Observations finales	30
Conclusions.....	30
ACRONYMES.....	31
GLOSSAIRE	32
RÉFÉRENCES CITÉES.....	39
ANNEXE 1. MODÈLE DE RAPPORT SUR L'ADNE	43
ANNEXE 2. ANNEXES SUR LES MÉTADONNÉES.....	45
Annexe 1. Cartes des sites et des lieux d'échantillonnage de l'étude	45
Annexe 2. Procédures de prévention de la contamination.....	45
Annexe 3. Protocole de qPCR.....	45
Annexe 4. Métadonnées et données sur la qPCR.....	46

RÉSUMÉ

On a de plus en plus recours à l'analyse de l'ADN à partir d'échantillons environnementaux (c.-à-d. l'ADN environnemental ou ADNe) comme méthode de suivi biologique non intrusive, sensible et souvent économique, seule ou en complément d'autres méthodes. Les nombreuses applications prometteuses fondées sur l'ADNe ont récemment entraîné une croissance importante de la recherche et développement sur l'ADNe; toutefois, la complexité et l'évolution rapide des méthodologies connexes ont créé des défis pour les gestionnaires de ressources au moment de décider de la manière d'appliquer les technologies liées à l'ADNe pour éclairer la prise de décisions.

Le présent document est la réponse à une demande d'avis scientifique sur l'utilisation de l'ADNe à l'appui du processus décisionnel sur les espèces et écosystèmes aquatiques, qui avait été présentée par les Programmes sur les espèces aquatiques envahissantes (EAE) et les espèces en péril (EP) de Pêches et Océans Canada. Le Comité national sur les espèces aquatiques envahissantes (CNEAE) a également estimé que le présent avis scientifique était nécessaire.

Ce document renferme deux composantes principales pour aider les gestionnaires des EAE et des EP : 1) des lignes directrices sur l'ADNe qui comprennent des définitions et des considérations liées à l'échantillonnage, à la détection et à l'analyse de l'ADN environnemental, à l'intention des gestionnaires des EAE et des EP; 2) un modèle de rapport qui définit les exigences en matière de rapports pour les fournisseurs de services d'ADNe qui produisent les résultats pour les gestionnaires des EAE et des EP. Le document porte sur les approches d'ADNe cible qui détectent de façon sélective l'ADN d'une seule espèce ou d'un seul taxon, souvent en utilisant la réaction en chaîne de la polymérase quantitative (qPCR).

Le présent document de recherche appuie l'avis scientifique, qui constitue pour le Ministère la première étape de la production de lignes directrices nationales sur l'ADNe en favorisant une plus grande uniformité dans les rapports et les communications entre les fournisseurs de services d'ADNe et les gestionnaires des EAE et EP. Nous recommandons aux gestionnaires des EAE et EP d'utiliser l'avis scientifique, les lignes directrices et le modèle de rapport dans leur plan de communication pour les projets relatifs à l'ADNe avant d'entamer un projet et pour interpréter les résultats. Les gestionnaires des EAE et des EP s'appuieront davantage sur l'utilisation de l'ADNe pour mettre en œuvre la législation fédérale, provinciale ou territoriale (p. ex [Règlement sur les EAE](#), [Loi sur les espèces en péril](#)) si les résultats des analyses d'ADNe sont présentés de manière uniforme.

INTRODUCTION

On recourt de plus en plus à des approches fondées sur l'ADN environnemental (ADNe) pour le suivi des espèces préoccupantes sur le plan de la conservation et de la gestion, notamment les espèces aquatiques envahissantes (EAE) et les espèces en péril (EP). Dans les présentes lignes directrices, l'ADN environnemental est défini comme l'ADN extrait d'échantillons environnementaux (p. ex. eau, biofilms, air, sédiments, contenus stomacaux, matières fécales) et analysé aux fins de suivi et de surveillance biologiques.

Pêches et Océans Canada (MPO), par l'entremise de ses programmes sur les EAE et EP, a jugé nécessaire d'élaborer des lignes directrices sur l'utilisation de l'ADNe à l'appui du processus décisionnel relatif à la gestion des espèces et écosystèmes aquatiques. Le Comité national sur les espèces aquatiques envahissantes (CNEAE), une plateforme de collaboration qui facilite la coordination nationale des enjeux liés aux EAE entre les gouvernements fédéral, provinciaux et territoriaux, a également estimé que des lignes directrices sur l'ADNe étaient nécessaires. Les programmes de surveillance et de suivi des EAE et EP ont commencé à inclure les approches fondées sur l'ADNe comme méthode rapide, sensible et souvent économique de détection et de surveillance de diverses espèces ou de différents taxons en toutes saisons et dans tous les environnements, y compris dans des endroits éloignés et disparates. L'analyse de l'ADNe peut fournir des données de suivi en complément des méthodes de suivi conventionnelles (p. ex. filets, pêche électrique) généralement sans qu'il soit nécessaire de recueillir ou de stresser les organismes vivants, ce qui en fait un outil idéal pour l'étude des EAE et EP qui sont rares, discrètes ou dont certains stades biologiques sont cryptiques. L'information génétique ainsi obtenue peut permettre de mieux comprendre la dynamique des populations, l'effectif des populations, la répartition et, dans certains cas, l'abondance des espèces ou des taxons.

L'analyse de l'ADN environnemental est un outil puissant pour de nombreux programmes de gestion des ressources et des écosystèmes, y compris les programmes sur les EAE et EP. Pour les applications concernant les EAE, la sensibilité des méthodes d'ADNe permet de détecter tôt de nouvelles invasions biologiques et des fronts de bio-invasion à de grandes échelles spatiales, et ainsi d'entreprendre des interventions de gestion et des efforts de contrôle rapides et opportuns avant que les populations ne s'établissent. La sensibilité des méthodes fondées sur l'ADNe est tout aussi précieuse pour le Programme sur les espèces en péril, qui utilise l'ADNe comme une approche non intrusive pour détecter et surveiller les EP et d'autres espèces nécessaires à la survie ou au rétablissement des EP (p. ex. espèces hôtes, espèces clés). En ce qui concerne les EP, l'ADN environnemental peut également être utilisé afin de : déterminer les facteurs de risque potentiels pour les EP (p. ex. espèces concurrentes); détecter les activités commerciales illégales; et fournir des preuves de braconnage, de la présence d'espèces (p. ex. pour délimiter les habitats qui doivent être protégés, comme l'habitat essentiel) et de l'absence d'espèces dans une zone donnée (p. ex. évaluation des demandes de permis). L'ARN environnemental (ARNe) peut également servir à détecter des espèces et, se dégradant plus rapidement que l'ADNe, peut être un meilleur indicateur pour détecter les organismes vivants et surveiller leur santé (voir d'autres applications possibles de l'ARNe dans Cristescu 2019). Cependant, il est difficile de travailler avec l'ARNe, et d'autres recherches sont nécessaires dans ce nouveau domaine. Les estimations de la biomasse et les changements relatifs de l'abondance peuvent également être inférés dans certaines études d'ADNe (Spear *et al.* 2020), bien que ces inférences exigent une validation et une vérification sur le terrain solides pour chaque nouvelle application (p. ex. espèces différentes, habitat, saison). Ensemble, ces nouvelles technologies peuvent aider à générer des données de biosurveillance au niveau de la population qui sont ensuite utilisées pour guider différentes options de gestion ou les efforts de rétablissement et pour appuyer les processus décisionnels relatifs aux EAE et EP.

Comme toutes les méthodes de surveillance, la détection de l'ADNe présente des limites, notamment : 1) l'ADNe est une méthode indirecte de suivi de la présence d'une espèce et ne peut fournir de données biologiques ou démographiques sur les organismes cibles (p. ex. longueur, état, recrutement); 2) les échantillons peuvent devenir contaminés (p. ex. transfert accidentel de l'ADN cible entre les sites), risquant de produire un faux positif ou une interprétation erronée des résultats; 3) les propriétés physiques et chimiques des milieux aquatiques peuvent avoir une incidence sur la concentration d'ADNe et la probabilité de détection (il est à noter que les probabilités de détection ne peuvent être déterminées qu'après une étude); 4) la détection de l'ADNe en elle-même ne confirme pas la présence d'un organisme vivant dans la zone échantillonnée (p. ex. l'ADN a pu être transporté dans le réseau hydrographique ou peut provenir d'une espèce de passage qui n'est plus présente); et 5) le manque d'uniformité dans l'estimation de la biomasse ou de l'abondance de l'espèce à partir des concentrations d'ADNe. Malgré ces limites, les nombreuses forces de la détection de l'ADNe en font un ajout précieux aux boîtes à outils des chercheurs et des gestionnaires, et les gestionnaires devraient la prendre en considération comme méthode de détection et de suivi.

En réponse aux demandes de normalisation des méthodes de détection d'ADNe et des présentations des résultats, de plus en plus de lignes directrices et de normes de laboratoire sont rapportées dans les publications primaires (p. ex. Goldberg *et al.* 2016; Shu *et al.* 2020). D'autres efforts de normalisation sont en cours par l'entremise de l'Association canadienne de normalisation (CSA 2019), du projet « Pathway to Increase Standards and Competency of eDNA Surveys (PISCeS) » coordonné à l'Université de Guelph, et de nombreux groupes internationaux. Bien que la communauté scientifique continue de progresser vers la normalisation des pratiques en matière d'ADNe, les gestionnaires du MPO qui utilisent actuellement ou envisagent d'utiliser les résultats d'ADNe pour appuyer la prise de décisions sur les EAE et EP ont besoin de lignes directrices rapidement.

De nombreuses méthodes différentes peuvent servir à détecter l'ADNe, chacune avec des applications ou des résultats souhaités différents. Elles peuvent être classées de façon générale en deux catégories : ciblées (visant une espèce unique ou propres à un taxon) et semi-ciblées (visant plusieurs espèces ou une communauté). Les approches ciblées, qui font l'objet des présentes lignes directrices, permettent de détecter et potentiellement de quantifier l'ADN d'une seule espèce ou d'un seul taxon; les analyses ciblées sont parfois combinées pour détecter plusieurs cibles simultanément (multiplexage). Les approches semi-ciblées (ou communautaires), souvent appelées métacodage à barres de l'ADN (ou métabarcoding), englobent un large éventail de techniques de séquençage à haut débit qui sont utilisées pour évaluer la composition biotique des écosystèmes (voir Bylemans *et al.* 2019 et Ruppert *et al.* 2019 pour une comparaison des approches ciblées et communautaires). Ces approches diffèrent des techniques ciblées; au lieu d'utiliser des amorces propres à l'espèce ou au taxon dans la réaction en chaîne de la polymérase (PCR; pour amplifier l'ADN) afin de détecter et de quantifier l'ADN cible, elles utilisent des amorces générales ou « universelles », puis le séquençage simultané des marqueurs de codage à barres de plusieurs espèces ou de plus grands groupes taxonomiques. Ces séquences sont ensuite appariées à des séquences de référence dans des bases de données génétiques en ligne (ou des bases de données de référence internes) pour identifier la communauté d'organismes présente dans l'échantillon. Les approches semi-ciblées sont plus nouvelles, plus complexes sur le plan méthodologique et analytique et évoluent très rapidement, tandis que les approches ciblées sont plus établies; c'est pourquoi le présent document porte sur les approches ciblées.

À l'heure actuelle, la réaction en chaîne de la polymérase quantitative (qPCR) est la technique d'analyse standard utilisée pour déterminer les quantités absolues ou relatives d'une séquence d'ADN connue dans un échantillon. Les approches ciblées fondées sur l'ADNe qui appliquent la qPCR, lorsqu'elles sont bien conçues et rigoureusement validées, sont efficaces pour détecter de

façon fiable l'ADNe des organismes aquatiques (voir Jerde *et al.* 2011 et Sigsgaard *et al.* 2015). Des plateformes de qPCR portables sur le terrain ont été mises au point et font actuellement l'objet d'essais pilotes menés par des scientifiques de l'environnement pour la détection sur place d'ADNe (Nguyen *et al.* 2018; Thomas *et al.* 2019). Ces nouvelles plateformes sont conçues pour fournir un processus complet d'échantillonnage et de détection de l'ADNe sur le terrain et sont capables de produire des résultats rapides (certaines en moins de 60 minutes). Les progrès réalisés dans les systèmes d'ADNe portables pourraient permettre d'améliorer l'efficacité de la détection précoce et du suivi des espèces, et les gestionnaires des espèces aquatiques envahissantes seraient alors en mesure d'ajuster leurs actions en temps quasi réel en réponse aux détections sur le terrain de l'ADNe d'une EAE.

En plus des tests qPCR, d'autres appareils ou approches peuvent servir à détecter l'ADNe. Bien que la réaction en chaîne de la polymérase conventionnelle (cPCR ou PCR) puisse être utilisée pour les études d'ADNe, sa sensibilité de détection est inférieure à celle de la qPCR et elle n'est donc pas recommandée pour l'analyse d'ADNe. La réaction en chaîne par polymérase digitale en micro-compartiments (par gouttelettes digitales; ddPCR) est également utilisée pour détecter l'ADNe. Cette technologie offre une précision et une sensibilité accrues pour déceler de faibles quantités d'ADN (Mauvisseau *et al.* 2019); cependant, les coûts plus élevés de la ddPCR ont limité la généralisation de l'utilisation de cette technologie relativement nouvelle. Des recherches ont montré que les résultats de la ddPCR sont acceptables pour les études d'ADNe (Capo *et al.* 2019; Mulero *et al.* 2019), et cette technologie se répandra probablement davantage à mesure que ses coûts continueront de baisser. La technologie CRISPR/Cas (Williams *et al.* 2019) est en cours d'exploration, mais une validation de principe est nécessaire avant que l'on puisse la recommander pour les études d'ADNe. Des instruments d'échantillonnage autonome de l'ADNe (p. ex. véhicules sous-marins, drones, processeurs d'échantillons) sont également en cours d'essai afin de déterminer si les options de prélèvement d'ADNe peuvent être améliorées au-delà de ce que les méthodes de suivi conventionnelles permettent actuellement (Yamahara *et al.* 2019; Sepulveda *et al.* 2020a).

OBJET DU PRÉSENT DOCUMENT

Des protocoles fondés sur l'ADNe, rigoureux et défendables, qui produisent des résultats répétables, reproductibles et exacts sont nécessaires pour que les organismes de réglementation et les gestionnaires acceptent les données probantes axées sur l'ADNe et s'y fient pour appuyer la prise de décisions. Pour commencer à répondre à ce besoin, le MPO a mené un projet qui a permis de déterminer l'état des connaissances sur l'ADNe grâce à la publication d'une revue de la littérature (Baillie *et al.* 2019). Le document de recherche actuel (les présentes lignes directrices) reprend celui de Baillie et ses collaborateurs (2019) en fournissant un modèle permettant une communication et une présentation uniformes et transparentes des résultats d'ADNe destinés aux gestionnaires des EAE et EP en tant que principaux utilisateurs finaux. L'objectif de ce document est de leur donner davantage confiance dans les données fournies et dans la façon d'utiliser les données sur l'ADNe par rapport aux données issues des méthodes de suivi conventionnelles. Ce document pourrait s'appliquer de façon plus générale aux gestionnaires du gouvernement et à d'autres utilisateurs.

Le présent document porte sur les approches ciblées fondées sur l'ADNe, car ce sont les mieux comprises, les plus fiables et les plus crédibles. Les approches semi-ciblées ne seront donc pas abordées spécifiquement. Bien qu'elles offrent un vaste potentiel d'évaluation de la biodiversité des communautés, elles sont moins bien établies et moins bien comprises que les approches ciblées, et elles présentent des complexités méthodologiques (p. ex. risque de biais de détection des espèces, erreurs dans la base de données de référence) qui rendent difficile l'élaboration de directives normalisées pour le moment. Cependant, le prélèvement, la filtration et l'extraction des

échantillons d'ADNe sont semblables pour les deux types d'approches, de sorte que les directives données ici sur ces composantes peuvent également s'appliquer aux études de métabarcoding d'ADNe. Ce document porte également sur l'utilisation d'approches ciblées fondées sur l'ADNe pour mener les évaluations qualitatives de la présence des espèces. À l'heure actuelle, les connaissances sur l'utilisation d'approches ciblées pour estimer l'abondance relative et la biomasse sont limitées. Comme c'est le cas pour d'autres méthodes de suivi classiques, il est difficile de déduire l'absence d'une espèce à l'aide des méthodes d'analyse d'ADNe et cela exige un échantillonnage approfondi et répété, souvent combiné à d'autres sources d'information biologique et à l'avis d'experts.

L'absence de normes de présentation pour l'ADNe et le manque d'uniformité des rapports entre les études d'ADNe (Nicholson *et al.* 2020) posent des problèmes aux utilisateurs finaux et aux fournisseurs de services d'ADNe (la Direction des sciences du MPO ou d'autres fournisseurs de services tiers) pour communiquer les résultats sur l'ADNe, ce qui crée de la confusion au sujet des mesures de gestion appropriées. Pour résoudre ces problèmes, nous fournissons deux documents d'orientation sur les approches ciblées fondées sur l'ADNe :

1. Des lignes directrices générales sur les approches ciblées fondées sur l'ADNe, y compris un glossaire de terminologie, qui donnent des renseignements essentiels pour la conception et la réalisation d'études d'ADNe et pour la production de rapports et l'interprétation des résultats.
2. Un modèle de rapport connexe sur l'ADNe qui indique les méthodes et résultats clés que les fournisseurs de services d'ADNe doivent présenter dans le modèle ou les annexes pour permettre l'interprétation des résultats d'ADNe (à l'annexe 1; version PDF remplissable à l'écran accessible sur le site Web du SCCS).

L'objet de ce document est d'encourager la présentation et la communication plus uniformes des résultats d'ADNe entre les utilisateurs finaux et les fournisseurs de services d'ADNe. Les composantes de ce document se veulent adaptables à un large éventail de protocoles ciblés d'échantillonnage et d'analyse pour l'ADNe. Ensemble, elles visent à accroître la confiance dans la détection de l'ADNe des EAE et EP et à en améliorer la fiabilité en fournissant les ressources et les outils nécessaires pour mieux présenter et communiquer des aspects importants des études d'ADNe afin d'appuyer la mise en œuvre des lois fédérales, provinciales ou territoriales (p. ex. [Règlement sur les EAE](#), [Loi sur les espèces en péril](#)). Toutefois, ce document peut également être utile à d'autres utilisateurs, chercheurs et praticiens travaillant avec l'ADNe.

RÉSUMÉ DU CONTENU ET DES INSTRUCTIONS

Ce document, qui appuie l'avis scientifique, comporte deux composantes principales : des lignes directrices et un modèle de rapport sur l'ADNe. Des précisions sur le contenu de chacune d'entre elles sont données plus loin. Les lignes directrices s'adressent principalement aux gestionnaires des EAE et EP qui souhaitent utiliser les analyses d'ADNe comme outil pour les aider à prendre des décisions solides et fondées sur la science, et le modèle de rapport est surtout destiné aux fournisseurs de services d'ADNe qui fournissent des résultats aux gestionnaires des EAE et EP. Les deux documents se recoupent et sont conçus pour être complémentaires, de sorte que les gestionnaires ou les autres utilisateurs finaux qui reçoivent les résultats d'ADNe au moyen du modèle de rapport ont toute l'information nécessaire dans les lignes directrices pour en tirer des renseignements solides afin d'évaluer avec confiance la qualité des résultats. De même, les fournisseurs de services trouveront dans les lignes directrices les instructions nécessaires pour remplir le modèle de rapport. Bien que de nombreux champs du modèle de rapport soient explicites, certains nécessiteront de se reporter aux lignes directrices pour consulter les instructions détaillées. Les lignes directrices sont divisées en sections qui correspondent aux sections du modèle de rapport.

Lignes directrices : Fournissent des renseignements essentiels pour la conception, la réalisation, la production de rapports et l'interprétation des études d'ADNe, y compris le plan d'étude, l'échantillonnage de l'ADNe dans divers substrats, le traitement des échantillons après la collecte, les méthodes de laboratoire et les stratégies d'interprétation des résultats de la qPCR pour déterminer la présence ou l'absence de l'ADN cible. Chaque section des lignes directrices commence par des considérations générales pour chaque étape du plan et de la mise en œuvre de l'étude d'ADNe, destinées aux gestionnaires des EAE et EP, afin de les aider à comprendre l'importance des renseignements demandés dans le modèle de rapport. Les instructions pour les fournisseurs de services d'ADNe remplissant le modèle de rapport sont données ensuite. Des encadrés sont utilisés dans le document pour expliquer les concepts fondamentaux liés à l'ADNe.

Bien que les lignes directrices et le modèle de rapport cherchent à uniformiser la communication et la présentation des résultats, les inférences sur la présence ou l'absence d'une espèce doivent être produites au cas par cas, en tenant compte de tous les autres renseignements disponibles (p. ex. la répartition connue de l'espèce, l'habitat convenable, les cycles de vie, la variabilité des environnements, les résultats des relevés précédents) et après des discussions entre les gestionnaires et les fournisseurs de services d'ADNe. Il est préférable que les lignes directrices soient suivies par les utilisateurs finaux et les experts scientifiques qui travaillent ensemble pour concevoir des études et interpréter les résultats d'une manière qui répond le mieux aux objectifs de l'étude.

Le glossaire définit les termes et les concepts associés aux approches ciblées fondées sur l'ADNe afin de promouvoir une compréhension et une communication plus uniformes des résultats d'ADNe.

Annexes sur les métadonnées : certains renseignements requis doivent être annexés au modèle de rapport sur l'ADNe, notamment quatre annexes obligatoires qui se trouvent à l'annexe 2 du présent document.

Annexe 1 – Cartes;

Annexe 2 – Procédures de prévention de la contamination;

Annexe 3 – Protocole de qPCR;

Annexe 4 – Métadonnées et données sur la qPCR.

D'autres renseignements propres au projet peuvent être annexés au modèle de rapport sur l'ADNe, au besoin.

Modèle de rapport sur l'ADNe : Les exigences en matière de rapport sont présentées dans le modèle de rapport sur l'ADNe. La fonction du modèle de rapport sur l'ADNe est de favoriser la présentation uniforme des résultats d'ADNe en fournissant un aperçu complet d'un projet fondé sur l'ADNe et en définissant l'information qui est cruciale pour démontrer l'intégrité scientifique et établir la fiabilité du projet et de ses résultats. Le modèle ne remplace pas un protocole détaillé, mais constitue plutôt un outil permettant de mettre en évidence et de compiler les aspects critiques d'un protocole et de sa mise en œuvre afin que les gestionnaires puissent plus facilement interpréter et évaluer les résultats. Le modèle de rapport doit être rempli dans un langage simple et avec suffisamment de détails pour qu'un gestionnaire des EAE et EP puisse comprendre ce qui a été fait. Les renseignements détaillés sur les échantillons individuels sont indiqués dans les annexes sur les métadonnées; le modèle sert principalement à donner des renseignements sommaires et des descriptions, ainsi que de brefs détails supplémentaires. Si certains éléments recommandés ne s'appliquent pas, inscrivez S.O. dans le modèle de rapport et donnez le plus de détails possible pour qu'un utilisateur final puisse comprendre les éléments et les résultats de l'étude.

SECTION I : ANALYSE D'ADNe – RENSEIGNEMENTS RELATIFS À LA SOUMISSION DES ÉCHANTILLONS

Sommaire de la section : Cette section fournit des informations sur les principaux éléments et protocoles de base du projet d'ADNe. Elle contient quatre annexes qui décrivent les techniques d'échantillonnage et les pratiques procédurales sur le terrain et en laboratoire (voir l'annexe 2 du présent document). Chaque annexe présente des renseignements importants qui facilitent la déclaration et la communication uniformes des résultats d'ADNe, ce qui les rend plus fiables. L'annexe 1 décrit les sites d'échantillonnage sur les cartes et les renseignements à donner sur toutes les cartes incluses dans une étude d'ADNe. L'information figurant sur les cartes doit illustrer l'effort d'échantillonnage dans la région géographique de l'étude et donner un aperçu des facteurs qui pourraient avoir une incidence sur la détection de l'ADNe. L'annexe 2 décrit les procédures et les mesures de prévention de la contamination qui ont été appliquées pour réduire la contamination sur le terrain et en laboratoire. Les procédures de prévention de la contamination sont particulièrement importantes pour traiter les échantillons d'ADNe, car elles peuvent influencer sur l'interprétation des résultats d'ADNe. L'annexe 3 présente les lignes directrices et les protocoles utilisés dans une analyse d'ADNe par qPCR (selon Bustin *et al.* 2009). Ces protocoles garantissent que les éléments importants de l'analyse sont communiqués aux utilisateurs finaux. L'annexe 4 décrit les métadonnées et les données sur la qPCR qui doivent être incluses pour permettre le suivi et la traçabilité des échantillons. Il est important de présenter ces données parce qu'elles contiennent des détails clés sur l'analyse des échantillons d'ADNe qui seront utilisés pour interpréter les résultats.

Renseignements relatifs à la soumission : Cette section comprend le titre du rapport, le numéro du projet, les renseignements sur l'accréditation et la certification du laboratoire, et précise le fournisseur de services d'ADNe et l'utilisateur final, ainsi que les coordonnées des deux.

Sommaire : Le sommaire doit être une brève description des objectifs de l'étude, y compris la justification et les principales constatations tirées des échantillons d'ADNe et des témoins. Les inférences sur la présence ou l'absence d'ADNe cible doivent refléter le niveau de validation et d'interprétation décrit aux sections E, F et G.

Annexes sur les métadonnées : Confirmez que les quatre annexes obligatoires décrites à l'annexe 2 du présent document ont été fournies. S'il y a lieu, dressez la liste des annexes supplémentaires qui décrivent des éléments importants du projet, comme il est indiqué dans les présentes lignes directrices (p. ex. approches expérimentales complexes, techniques d'analyse ou résultats en dehors de la portée visée ici).

SECTION II : PLAN D'ÉTUDE ET ÉCHANTILLONNAGE DE L'ADNe

Sommaire de la section : Cette section fournit des informations sur les principaux éléments de l'élaboration d'une étude solide d'ADNe afin de pouvoir interpréter correctement les résultats. Les méthodes choisies pour prélever l'ADN dans l'environnement (c.-à-d. les méthodes sur le terrain) sont essentielles pour l'interprétation des résultats et doivent être choisies soigneusement pour atteindre les objectifs de l'étude. L'interprétation des résultats dépend d'un plan d'échantillonnage et d'un choix de méthodes appropriés; par conséquent, la méthode choisie devrait tenir compte des études antérieures, des contraintes logistiques, de la biologie et des préférences en matière d'habitat de l'espèce cible et des caractéristiques de l'eau. Bon nombre des considérations relatives au plan d'étude et à l'échantillonnage ont été élaborées dans l'optique de l'échantillonnage des écosystèmes; cependant, on peut adapter les lignes directrices et les outils pour les utiliser dans d'autres types de situations où l'on peut utiliser l'ADNe (p. ex. analyses de ballast, des biosalissures, des poissons-appâts).

Cette section comprend trois sous-sections : information sur l'étude, plan d'étude et prélèvement des échantillons d'ADNe. La sous-section Information sur l'étude décrit six éléments qui doivent être mentionnés et expliqués dans chaque étude d'ADNe, comme les objectifs de l'étude et sa région géographique. La sous-section Plan d'étude décrit les étapes critiques de la conception d'une étude d'ADNe. Afin de bien communiquer l'importance de ces étapes, les termes d'échantillonnage importants ont été clairement définis dans cette sous-section pour les fournisseurs de services et les utilisateurs finaux. Cette sous-section traite également de la probabilité de détection de l'ADNe et des divers facteurs qui peuvent l'influencer, comme le taux d'excrétion de l'organisme cible et les événements météorologiques. Il est important d'inclure des témoins (échantillons contrôles) dans le plan de l'étude afin de détecter tous les faux négatifs ou faux positifs et de valider les résultats ou de mettre en évidence les sources d'erreur. La dernière sous-section, Prélèvement des échantillons d'ADNe, décrit et définit les renseignements nécessaires pour présenter la méthodologie de capture de l'ADNe, comme la profondeur de l'échantillonnage et la méthode de traitement de l'échantillon.

Comme c'est le cas pour d'autres aspects du flux de travail d'une analyse d'ADNe, il est important que les gestionnaires consultent un spécialiste d'ADNe (p. ex. Direction des sciences du MPO) au cas par cas afin d'optimiser le plan d'étude, en particulier pour les études qui nécessitent l'élaboration d'un nouveau plan d'échantillonnage ou de nouvelles méthodes de laboratoire. Il est recommandé d'élaborer un plan de communication *a priori* afin d'établir le flux d'information qui devrait circuler entre toutes les parties participant à une étude d'ADNe, du plan de l'étude jusqu'à la notification des résultats d'ADNe (encadré 1).

Encadré 1. Plan de communication

Utilisateur final d'ADNe : gestionnaire, client ou demandeur de services d'ADNe qui utilise les résultats de l'ADNe ou en est le destinataire.

Fournisseur de services d'ADNe : il est reconnu que les services d'ADNe peuvent faire intervenir plus d'une entité. Aux fins de la communication et de la production de rapports, le fournisseur de services d'ADNe est le gestionnaire de projet global qui est chargé de communiquer les résultats à l'utilisateur final.

- Les plans de communication garantissent que les extraits du projet sont présentés d'une manière exhaustive et transparente qui répond aux besoins de l'utilisateur final, afin de lui permettre de prendre des décisions fondées sur des données probantes en temps opportun.
- Les plans de communication indiquent comment, quand et quelle information est transmise aux utilisateurs finaux et aux fournisseurs de services d'ADNe.
- Les plans de communication doivent être ajustables, afin de pouvoir évoluer en fonction des besoins changeants et des opportunités.
- Au début d'un projet, l'utilisateur final et le fournisseur de services d'ADNe doivent élaborer conjointement un plan de communication, qui précise les éléments suivants :
 - les points de contact des utilisateurs finaux et des fournisseurs de services;
 - la raison des analyses et, au besoin, les répercussions et les conséquences possibles des résultats ou les mesures pouvant en découler :
 - ces renseignements peuvent avoir une incidence sur le plan de l'échantillonnage sur le terrain et de l'analyse en laboratoire, ainsi que sur les calendriers de présentation des résultats;

- il est essentiel de décrire avant le début de l'étude comment l'amplification imprévue des témoins négatifs sera traitée.
- Les échéanciers estimatifs de la présentation des résultats par le fournisseur de services d'ADNe et la façon d'informer l'utilisateur final des changements ultérieurs aux calendriers ou aux plans/conceptions de l'échantillonnage.
- Par exemple, pour les projets où la détection peut avoir des répercussions importantes, comme la détection précoce des EAE, il est recommandé de présenter les résultats à mesure qu'ils sont obtenus (c.-à-d. la détection présumée d'EAE), tandis que d'autres peuvent être présentés à la fin du projet.
- Le cas échéant, planifiez la façon dont les résultats et l'incertitude peuvent être communiqués au public.

A. Information sur l'étude

Considérations générales : Cette section fournit des informations de base sur une étude d'ADNe. Les facteurs suivants peuvent influencer sur les méthodes choisies pour prélever l'ADNe, sur la probabilité de détection de l'espèce ou sur la validité des résultats.

A.1 Espèce ciblée : Indiquez le nom courant et le nom latin de l'espèce ciblée par l'étude.

A.2 Objectifs de l'étude : Indiquez la raison des analyses (p. ex. détection de l'espèce pour la conservation, détection précoce des EAE, propagation secondaire des EAE, efficacité des mesures d'éradication des EAE, estimation de la taille des populations des EP). Des renseignements supplémentaires peuvent être nécessaires pour expliquer la raison des analyses (p. ex. échantillonnage avant et après l'éradication, détection des EP pour déterminer des sites possibles d'aires marines protégées [AMP], échantillonnage simultané des EAE et EP).

A.3 Emplacement ou région géographique : Indiquez et décrivez les emplacements géo-écologiques ou les zones d'étude (p. ex. province, parc national, zone de gestion des pêches, zone de gestion de la baie). L'encadré 2 donne de plus amples renseignements à ce sujet. Des cartes devraient être ajoutées à l'annexe 1.

A.4 Date d'échantillonnage (période) : Indiquez les dates de début et de fin du projet au format mm/jj/aaaa. Les dates de collecte des différents échantillons doivent être indiquées dans les métadonnées.

A.5 Types d'échantillons : Indiquez le substrat échantillonné à l'aide du menu déroulant (c.-à-d. eau [eau douce, saumâtre, eau de mer], sédiments, contenu de l'estomac et des intestins, zooplancton en vrac ou autre). Si vous cochez « Autre », veuillez expliquer : sélectionnez « échantillon en vrac » si l'ADN a été extrait d'une fraction d'un plus grand mélange d'organismes (p. ex. zooplancton et microorganismes).

A.6 Bases de données cartographiques : Indiquez si les données générées ici ont été archivées dans des bases de données cartographiques en libre accès (p. ex. projet Aquatic eDNAAtlas) et donnez des détails, s'il y a lieu.

Encadré 2. Définir les régions géographiques, les sites, les stations et la réplication

Il convient de définir clairement un plan d'échantillonnage d'ADNe, et les définitions proposées ici visent à faciliter la communication entre les fournisseurs de services d'ADNe et les utilisateurs finaux.

L'**emplacement ou la région géographique** sont des unités générales qui décrivent la zone géographique ou le contexte de l'étude (p. ex. province, parc national, zone de gestion des pêches, zone de gestion de la baie).

Les **sites** sont les endroits physiques où des échantillons ont été prélevés; ils devraient être relativement indépendants les uns des autres, comme des réseaux hydrographiques et des habitats différents (p. ex. lacs, rivières, étangs, zones marines, ordre des affluents, marinas).

Les **stations** désignent des emplacements d'échantillonnage spatialement distincts dans un site (c.-à-d. les répliqués spatiaux) et sont habituellement utilisées pour améliorer la détection de l'espèce ou évaluer la variation de l'ADNe dans les réseaux hydrographiques ou les habitats (p. ex. échantillons distribués selon un quadrillage ou un plan en transects entourant un site d'aquaculture, cours supérieur et inférieur d'une rivière, emplacements dans de vastes milieux d'eaux libres).

Les **répliqués d'échantillons sur le terrain** sont des unités d'échantillonnage distinctes prélevées le plus près possible du même point dans l'espace et le temps, entreposées dans des contenants distincts et analysées séparément. Le nombre de répliqués d'échantillons sur le terrain peut varier en fonction de la logistique et des objectifs d'une étude.

Les **répliqués techniques de qPCR** sont des réactions de la qPCR qui sont des répétitions du même extrait d'ADN.

Les **répliqués techniques de filtres** sont obtenus en coupant les filtres en morceaux et en analysant chaque morceau séparément.

Selon les objectifs, certaines études ont un seul site avec plusieurs stations, ou plusieurs sites avec une ou plusieurs stations. Les répliqués augmentent la probabilité de détection et sont utilisés pour évaluer les variables qui influent sur la probabilité de détection (p. ex. recherche sur l'écologie de l'ADNe) ou pour modéliser les endroits où une espèce peut se trouver (p. ex. modélisation de l'occupation). Ils donnent une idée de la répétabilité de la détection, qui est importante pour évaluer s'il convient d'intensifier l'effort d'échantillonnage pour améliorer la probabilité de détection de l'espèce. Un plus grand nombre de sites et de stations peut être nécessaire lorsque l'organisme cible est rare. Il est souvent recommandé d'échantillonner plusieurs stations dans un même site et plusieurs répliqués sur le terrain, car il est possible que l'ADNe ne soit pas distribué de façon homogène (p. ex. l'ADNe peut être très fragmenté dans les sédiments) dans l'environnement.

Dans une grande étendue d'eau, le prélèvement et la combinaison de plusieurs échantillons d'eau (p. ex. un échantillonnage composite selon un quadrillage) sont un moyen de réduire le nombre total d'échantillons et d'accroître la réplication.

B. Plan d'étude

Considérations générales : Cette section fournit des renseignements sur le plan et la planification de l'étude d'ADNe, afin d'atteindre les objectifs du gestionnaire des EAE ou EP, ainsi que sur la façon de décrire ou de présenter les informations clés qui peuvent influencer sur la probabilité de détecter un organisme. Il est conseillé d'effectuer une étude préliminaire ou un projet pilote pour déterminer si les méthodologies fondées sur l'ADNe (p. ex. effort d'échantillonnage, analyse par qPCR) seront efficaces pour atteindre les objectifs de l'étude, car le coût des faux négatifs pourrait être très élevé si des mesures de gestion inadéquates sont déclenchées (p. ex. efforts d'éradication, suivi de l'introduction d'EAE).

B.1 Types d'écosystèmes : Indiquez les types d'habitats échantillonnés (p. ex. lac, rivière, cours d'eau, terre humide, étang, estuaire, zone côtière, zone marine ou autre). Si vous cochez

« Autre », veuillez fournir une brève description. Pour les EAE en particulier, ajoutez des détails propres au domaine (p. ex. points d'entrée, ainsi que les vecteurs) s'ils sont importants pour l'objectif de l'étude.

B.2 Plan d'échantillonnage : Expliquez comment le plan d'échantillonnage et l'effort d'échantillonnage contribuent à l'atteinte des objectifs de l'étude.

Décrivez le plan d'échantillonnage (transect, grille, aléatoire) et la façon dont les échantillons sont distribués (p. ex. stations tous les 100 m sur un transect de 1 000 m; 24 stations dans un quadrillage de 1 500 m²). Indiquez l'emplacement des stations sur une carte (annexe 1).

Expliquez comment le plan d'échantillonnage a été élaboré pour optimiser la détection de l'espèce, y compris les facteurs écologiques (p. ex. la biologie de l'espèce) et environnementaux, et justifiez le choix des lieux d'échantillonnage (sites, stations; voir l'encadré 2).

Indiquez comment le plan d'échantillonnage spatio-temporel a été choisi pour optimiser la détection de l'espèce ou du taxon cible. Par exemple, l'intégration de la connaissance de la répartition de la population et du moment de la migration, de l'échantillonnage de jour ou de nuit en raison de la migration quotidienne verticale, de la profondeur d'échantillonnage choisie pour correspondre aux préférences en matière d'habitat, des périodes saisonnières et de reproduction pour cibler un stade biologique précis, d'une marée particulière choisie en raison des apports d'eau douce ou de la réduction de la variation potentielle peut aider à améliorer les probabilités de détection (voir plus d'exemples dans l'encadré 3).

Indiquez si la méthode sur le terrain a été choisie parce qu'il fallait suivre une norme à des fins de comparaison, en fonction d'une étude pilote précédente, ou parce que l'étude fait partie d'une étude plus vaste dont les méthodes sont prescrites. Fournissez des références et signalez les écarts par rapport à la référence, à l'original ou à une étude et à un plan d'échantillonnage déjà établis.

Si le plan d'étude a été modifié pour tenir compte de conditions d'échantillonnage sous-optimales (p. ex. facteurs météorologiques, circonstances imprévues, défaillance de l'équipement), indiquez les changements qui ont été apportés et leur justification. Les écarts d'un échantillon par rapport au plan d'échantillonnage susmentionné et la justification des ajustements doivent être consignés dans les métadonnées. Tous les aspects importants d'un plan d'échantillonnage qui peuvent clarifier la façon dont l'échantillonnage a été effectué doivent être fournis. Il convient d'ajouter une annexe si un texte plus long est nécessaire pour comprendre comment le plan d'échantillonnage a été élaboré et pour expliquer les modifications apportées ultérieurement au plan d'origine.

B.3 Nombre de sites échantillonnés : Indiquez le nombre total de sites échantillonnés. Pour la définition des sites, voir l'encadré 2.

Il convient de justifier la façon dont les sites ont été choisis pour atteindre les objectifs de l'étude dans la section Plan d'échantillonnage (voir B.2). Les coordonnées GPS des sites doivent être fournies dans les métadonnées.

B.4 Nombre de stations échantillonnées dans les sites : Indiquez le nombre de stations échantillonnées sur chaque site et expliquez brièvement les raisons de la variabilité entre les sites (p. ex. taille du lac, accessibilité, couverture de divers environnements [en amont, en aval, prise d'eau sous-lacustre]). Pour la définition des stations, voir l'encadré 2.

B.5 Nombre de répliqués d'échantillons sur le terrain : Indiquez le nombre de répliqués prélevés à chaque station ou à chaque site. Précisez si un logiciel de conception d'enquêtes prédictives a été utilisé pour guider le plan d'échantillonnage (p. ex. SIBYL^{MC}). Voir l'encadré 4 pour connaître l'importance de la réplification, de la répétabilité et de la reproductibilité.

B.6 Série chronologique : S'il y a lieu, indiquez le nombre de répétitions effectuées aux stations ou sites échantillonnés (c.-à-d. si des échantillonnages répétés ont été effectués) et les dates d'échantillonnage.

B.7 Conditions environnementales, observations pertinentes et données de terrain supplémentaires : Signalez tous les facteurs environnementaux qui peuvent influencer sur la quantité, le transport et le devenir de l'ADNe (voir l'encadré 3), y compris, mais sans s'y limiter, les proliférations d'algues, les conditions/événements météorologiques dignes de mention, les courants forts et les conditions eutrophes ou oligotrophes. Énumérez toutes les données environnementales supplémentaires et la façon dont elles ont été recueillies (p. ex. mesure, fréquence et équipement utilisé).

B.8 Blancs et témoins de terrain : Décrivez le nombre de blancs d'échantillon et d'autres témoins sur le terrain qui ont été utilisés par visite du site ou de la station, ou par jour. Indiquez si des sites ont été utilisés comme témoins (emplacement où l'ADNe cible est présent, utilisé comme témoin positif *in situ* du projet/sur le terrain, ou emplacement où l'on pense que l'ADNe cible est absent et utilisé comme témoin négatif *in situ* sur le terrain). Des renseignements généraux sur les types de témoins sont donnés dans l'encadré 5. Présentez les résultats des témoins dans les sections F.2 à F.4.

Encadré 3. Processus écologiques et environnementaux pertinents pour le plan de l'étude d'ADNe

La probabilité de détecter l'ADNe est directement proportionnelle à la vitesse à laquelle l'ADNe de l'organisme cible pénètre dans l'environnement et est inversement proportionnelle à la vitesse à laquelle le signal de l'ADNe est perdu des échantillons environnementaux (p. ex. sous l'effet de la sédimentation, de la dégradation, d'une dilution excessive). De nombreux facteurs écologiques et environnementaux peuvent influencer sur la libération de l'ADN, ainsi que sur la dilution et la persistance de l'ADN dans l'environnement.

Libération de l'ADN

La vitesse à laquelle l'ADN d'un organisme est excrété ou rejeté dans l'environnement (par les matières fécales, l'urine, les cellules épithéliales, le mucus) varie selon la taille de l'organisme, le stade biologique et le métabolisme (Maruyama *et al.* 2014; Klymus *et al.* 2015; Sansom et Sassoubre 2017). Le taux d'excrétion varie également en fonction de l'écologie de l'espèce, des profils saisonniers et des conditions environnementales. Par exemple, la probabilité de détection peut être plus élevée pour certains organismes :

- pendant la reproduction, en raison de la libération de gamètes (Tillotson *et al.* 2018) et de la dégradation des larves mortes;
- à des températures de l'eau plus élevées (Lacoursière-Roussel *et al.* 2016a, Jo *et al.* 2019);
- lors d'un stress accru, comme l'acclimatation à un nouvel environnement (Takahara *et al.* 2012);
- chez les espèces couvertes de mucus (p. ex. poissons, mollusques; Lacoursière-Roussel *et al.* 2016b);
- à une densité de population plus forte (p. ex. Schloesser *et al.* 2018);
- pendant certaines périodes d'activité animale plus élevée (p. ex. migration, nidification; de Souza *et al.* 2016 et Sevellec *et al.* 2020);

- après qu'une tempête ou une perturbation a remis en suspension des sédiments; toutefois, ce signal doit être interprété avec prudence, car l'ADNe peut persister pendant longtemps dans les sédiments. Une détection après une tempête peut donc ne pas refléter la présence actuelle de l'espèce (McNair *et al.* 2012; Wilcox *et al.* 2016; Shogren *et al.* 2017, 2018).

Dilution/persistance de l'ADN dans l'environnement

Le taux de dilution et de persistance de l'ADNe varie selon les caractéristiques particulières de l'écosystème, comme le transport et la matrice d'eau (les composantes d'un échantillon autres que l'ADNe; Harrison *et al.* 2019). Les deux sont soumis à des changements importants pendant des événements extrêmes (p. ex. tempêtes) ou des processus récurrents (p. ex. marées). Par exemple, la probabilité de détection de l'ADNe peut être plus élevée :

- près de la source (à mesure que la distance augmente, les effets de la dilution affaiblissent le signal de l'ADNe);
- en aval d'une source (tissus, cellules et flux d'ADN libre vers l'aval);
- pendant les périodes plus sèches ou d'eaux plus basses (les pluies abondantes et les niveaux d'eau élevés diminuent la probabilité de détection en raison des effets de la dilution);
- les sédiments peuvent être remis en suspension à la suite d'une tempête ou de perturbations et libérer de l'ADNe ancien; par conséquent, la détection de l'ADNe après une tempête ou une perturbation peut ne pas refléter la présence locale et récente de l'espèce (McNair *et al.* 2012; Wilcox *et al.* 2016; Shogren *et al.* 2017, 2018).
- au milieu de la rivière (un débit plus élevé au milieu de la rivière peut transporter l'ADN plus loin en aval de la source);
- dans les réseaux estuariens influencés par les marées, la couche d'eau de surface contient de l'ADN des zones en amont;
- dans la couche de stratification où réside l'organisme (ou encore, envisagez de mener l'échantillonnage pendant le mélange des eaux de lacs ou d'échantillonner toute la colonne d'eau);
- au débit sortant/exutoire du lac ou à la prise d'eau sous-lacustre pour capturer l'ADNe des zones en amont;
- où l'eau contient moins de composés inhibiteurs (Schrader *et al.* 2012);
- où les taux de dégradation de l'ADNe sont les plus faibles (p. ex. température plus froide, faible rayonnement UV, faible activité microbienne et chimie particulière de l'eau [p. ex. présence du pesticide diazinon; Pourmoghadam *et al.* 2019]).

Encadré 4. Accroître la fiabilité des résultats d'ADNe grâce à la réplication, la répétabilité et la reproductibilité

La réplication est reconnue dans toutes les études d'ADNe comme essentielle pour établir la fiabilité des résultats afin de répondre à l'incertitude potentielle des détections d'ADNe et de rehausser la confiance dans les résultats. Elle peut se faire de multiples façons et le type de réplication nécessaire dans un projet n'est pas encore normalisé (voir Ficetola *et al.* 2015 et Erickson *et al.* 2019). Le type de réplication requis dans un projet dépend d'une multitude de facteurs propres à l'étude, dont l'abondance présumée de l'organisme ciblé, la tolérance au risque de l'utilisateur final, les coûts et l'accessibilité de l'échantillonnage. La question de savoir s'il est plus efficace d'ajouter des répliqués de qPCR, d'augmenter les répliqués d'échantillons, de répéter

l'échantillonnage dans le temps ou de reproduire un projet avec un autre fournisseur de services d'ADNe variera selon les études et influera sur les coûts. De plus, l'accessibilité des sites d'échantillonnage peut modifier le compromis coûts-avantages de l'échantillonnage moins intensif au départ avec reprise de l'échantillonnage au besoin plutôt que de l'échantillonnage intensif dès le départ.

La réplication vise deux objectifs principaux. L'un est de déterminer la *répétabilité* des résultats des analyses, que l'Organisation mondiale de la santé animale définit comme le niveau de concordance entre les résultats des répliqués dans et entre les analyses effectuées selon la même méthode dans un laboratoire donné (OIE 2019). Le second consiste à déterminer la *reproductibilité* des résultats des analyses, c'est-à-dire la capacité d'une méthode d'analyse de fournir des résultats uniformes lorsqu'on analyse des aliquotes des mêmes échantillons dans des laboratoires différents au moyen d'un test *identique* (OIE 2019). Bien que la reproductibilité ne soit souvent pas testée pour les analyses d'ADNe, il s'agit néanmoins d'un paramètre important pour établir la fiabilité des analyses et leur « solidité technique » générale (voir Bustin et Nolan 2017 et Sepulveda *et al.* 2020b).

La réplication est particulièrement importante pour la détection de l'ADNe lorsque la concentration de l'ADN cible dans l'environnement est faible, car cela peut générer une variance importante parmi les répliqués sur le terrain et de qPCR. En revanche, lorsque la concentration de l'ADN cible dans l'environnement est élevée, la variance entre les répliqués des échantillons devrait être plus faible. La réplication des tests d'ADNe et la reproduction des projets fondés sur l'ADNe rendront la détection de l'ADNe à faible concentration de plus en plus fiable. Différentes options peuvent être envisagées pour la réplication dans les études d'ADNe, comme la collecte de multiples répliqués sur le terrain à divers endroits de chaque site au cours d'une seule visite (réplication spatiale) ou à différents moments (réplication temporelle), l'analyse de multiples répliqués de qPCR sur le même extrait d'ADN, l'utilisation de multiples marqueurs génétiques et la reproduction du test en laboratoire dans un laboratoire différent.

Encadré 5. Témoins (contrôles) pour évaluer les sources possibles d'erreur

Les résultats obtenus à partir de témoins négatifs et positifs sont un élément crucial de l'analyse et de l'interprétation des résultats d'ADNe. Les témoins sont intégrés tout au long du flux de travail d'une analyse d'ADNe, fournissant des informations sur la validité et la fiabilité des résultats, et indiquant où les processus fondés sur l'ADNe doivent être améliorés ou peuvent avoir échoué. Un plus grand nombre de témoins à différentes étapes du traitement pour détecter les sources potentielles d'erreur pendant le traitement de l'échantillon augmentera généralement la confiance à l'égard des résultats. En règle générale, le nombre de témoins doit refléter la tolérance à l'erreur en fonction des objectifs du projet. Il faut décrire les critères utilisés pour déterminer si les témoins positifs ou négatifs ont réussi ou échoué.

Les **témoins négatifs** sont souvent appelés négatifs, blancs d'échantillon ou témoins sans matrice (TSM). Il s'agit d'échantillons qui sont soumis aux mêmes procédures que les échantillons d'ADNe, mais auxquels l'analyte cible (ADNe) n'est pas inclus ou ajouté. Des témoins négatifs sont inclus à diverses étapes du flux de travail d'une analyse d'ADNe pour déterminer les sources de contamination, pouvant mener à la détection de **faux positifs**. Les témoins négatifs sont habituellement inclus pendant l'échantillonnage et la filtration sur le terrain (pour détecter la contamination pendant le prélèvement et la capture de l'ADNe de l'échantillon), l'extraction de l'ADN (pour détecter la contamination croisée entre les échantillons pendant l'extraction de l'ADNe) et la qPCR (pour détecter la contamination pendant la qPCR et établir une base de référence de fluorescence pour améliorer l'interprétation des données). Si les témoins négatifs détectent l'ADN, il faut répéter l'analyse, si possible (p. ex. en utilisant de nouveaux réactifs de qPCR ou en

extrayant la partie sauvegardée d'un filtre). Le seuil utilisé pour déterminer si un témoin négatif a réussi ou échoué doit être défendable et établi avant les analyses des résultats.

Un **témoin positif** fait référence à un témoin dans un traitement dont on sait qu'il produit des résultats. Les témoins positifs servent à évaluer la validité et la fiabilité des résultats d'ADNe en garantissant que les procédures du flux de travail de l'analyse d'ADNe se déroulent comme prévu ou sont utilisés comme étalons pour relever les écarts par rapport aux résultats attendus. Ils peuvent être fabriqués à partir de fragments d'ADN synthétique (p. ex. gBlocks), d'amplicons de la PCR, d'une suspension tissulaire, d'ADN provenant des organismes cibles, etc. Traités comme des échantillons indépendants ou ajoutés à des échantillons d'ADNe (« enrichis »), les témoins positifs identifient les sources potentielles d'erreur qui peuvent avoir une incidence sur l'interprétation des données et contribuer à la déclaration de **faux négatifs**. Les témoins positifs courants comprennent, sans toutefois s'y limiter, les positifs de l'extraction (pour indiquer le succès de l'extraction de l'ADNe) et les positifs de la qPCR pour indiquer le succès de la réaction de qPCR.

C. Prélèvement des échantillons d'ADNe

Considérations générales : La présente section donne un aperçu de la façon de présenter la méthodologie utilisée pour le prélèvement des échantillons d'ADNe. Il est essentiel de prendre des mesures de prévention de la contamination pendant le prélèvement d'échantillons d'ADNe (voir l'encadré 6 pour plus de renseignements sur les mesures de prévention de la contamination) et de les décrire à l'annexe 2. Les métadonnées propres à l'échantillon doivent figurer à l'annexe 4.

C.1 Méthode d'échantillonnage : Indiquez le contenant ou le dispositif utilisé pour prélever l'échantillon (p. ex. bouteille d'eau, filet à plancton, filet troubleau, système automatisé ou portatif d'échantillonnage de l'ADNe sur le terrain, pompe de cale, carottier de sédiments, benne Van Veen ou autre [donnez des détails si vous avez sélectionné « Autre »]). Précisez le fabricant et le modèle.

C.2 Volume/poids de l'échantillon : Indiquez le volume ou le poids de l'échantillon mesuré ou ciblé pendant la capture de l'ADNe. Consignez tous les détails supplémentaires (p. ex. échantillons manquants, filtration incomplète en raison d'une obstruction, échantillons individuels qui ont dévié du volume/poids cible) directement dans le modèle de rapport ou dans les métadonnées annexées (annexe 4), selon le cas.

C.3 Profondeur(s) de l'échantillonnage : Donnez une explication détaillée des profondeurs auxquelles l'échantillonnage a été effectué (p. ex. échantillonnage des eaux de surface, à 3 m au-dessus du fond marin, à 10 cm sous la surface de l'eau; carotte prélevée de la surface des sédiments à 2 cm de profondeur).

C.4 Entreposage des échantillons sur le terrain et délai avant le traitement : Indiquez comment et pendant combien de temps les échantillons ont été entreposés entre le prélèvement et le traitement, s'il y a lieu. Par exemple, « bacs isolants avec glace et filtration dans les 24 heures ». Tout écart par rapport au protocole décrit doit être noté dans les métadonnées. Pour les échantillons solides (p. ex. les sédiments), fournissez des détails pertinents. L'entreposage au froid ralentit le taux de dégradation de l'ADNe, mais ne l'arrête pas. Afin de réduire au minimum la dégradation possible des échantillons et de limiter le risque de faux négatifs, le temps entre le prélèvement et le traitement des échantillons devrait être maintenu à un minimum; le traitement devrait idéalement avoir lieu dans les 24 heures suivant le prélèvement, et au maximum 48 heures après celui-ci (Hinlo *et al.* 2017).

C.5 Méthode de traitement des échantillons : Décrivez la méthode utilisée pour récupérer ou concentrer l'ADNe des échantillons prélevés sur le terrain, y compris l'équipement utilisé (p. ex. filtration : pompe péristaltique, pompe à vide, seringue, filtration automatisée). Précisez si l'équipement utilisé était jetable ou avait déjà été utilisé et stérilisé (p. ex. le boîtier du filtre peut être stérilisé et réutilisé un nombre limité de fois). Dans le cas des échantillons solides, décrivez les étapes du traitement avant l'extraction de l'ADN (p. ex. méthode de conservation de l'ADN). Indiquez le fabricant et le modèle de l'équipement; précisez le fabricant et le numéro de catalogue des réactifs.

C.6 Type de filtre et taille des pores : Indiquez le diamètre, le matériau, la taille des pores et le numéro de catalogue du fabricant des filtres utilisés, le cas échéant.

C.7 Conservation des échantillons : Décrivez les conditions de conservation des échantillons prélevés et traités sur le terrain (p. ex. filtres), y compris le type d'agent de conservation (p. ex. dessiccateur, tampon, conditions de congélation, etc.), ainsi que la quantité / concentration et les conditions d'entreposage. La qualité de l'échantillon et de l'ADN est un facteur clé du succès des étapes suivantes (extraction, PCR, etc.).

Encadré 6. Prévention de la contamination

Étant donné que l'analyse d'ADNe cible l'ADN trace, même de très faibles niveaux de contamination peuvent compliquer l'interprétation. Les mesures de prévention de la contamination sont essentielles tout au long des étapes de travail et doivent être strictement appliquées (Thomsen et Willerslev 2015; Goldberg *et al.* 2016).

Les deux principales sources de contamination sont l'ADN externe (p. ex. l'ADN introduit par les navires, les eaux usées, les écloseries ou les laboratoires qui ont été en contact avec l'organisme cible) et la contamination croisée (p. ex. l'ADN transféré d'un site d'échantillonnage à un autre ou d'un échantillon à un autre).

Il est fortement recommandé de choisir un fournisseur de services d'ADNe qui dispose déjà de procédures opérationnelles normalisées (PON) formelles et de bonnes pratiques de laboratoire (BPL; OCDE 1998) ou de politiques équivalentes mises en place spécialement pour la prévention de la contamination ou l'accréditation des laboratoires.

Plusieurs approches utilisées ensemble réduiront considérablement le risque de contamination tout au long des étapes de travail :

- des gants jetables, qui sont changés fréquemment pour prévenir la contamination croisée entre les échantillons d'ADNe, réduire au minimum la contamination de l'ADN externe des fournitures et du matériel pendant les processus en laboratoire ou sur le terrain, et prévenir la dégradation des échantillons par des moyens introduits par l'analyste d'ADNe (p. ex. enzymes, bactéries);
- la formation est essentielle pour limiter la contamination dans tous les projets, y compris ceux qui font appel à la participation du public et à la science citoyenne;
- un nettoyage minutieux du matériel de laboratoire et de terrain à l'eau de Javel de qualité commerciale diluée (hypochlorite de sodium) ou selon d'autres méthodes approuvées, en veillant à ce qu'il ne reste pas de désinfectant sur le matériel (p. ex. résidu d'eau de Javel), car cela peut mener à de faux négatifs.

Les stratégies essentielles de prévention de la contamination utilisées pendant le prélèvement d'échantillons sur le terrain comprennent, sans toutefois s'y limiter :

- procéder à l'échantillonnage de l'ADNe avant d'effectuer les autres tâches susceptibles de perturber le milieu (eau) échantillonné;
- réaliser l'échantillonnage à une distance donnée du navire pour l'échantillonnage à partir d'un bateau;
- planifier avec soin les lieux d'échantillonnage afin de réduire au minimum la contamination provenant de sources en amont (p. ex. prélever les échantillons face au courant, échantillonner vers l'amont, passer des sites à faible probabilité aux sites à probabilité plus élevée);
- opter pour l'échantillonnage à terre lorsque c'est possible et veiller à ce que les cuissardes, les bottes et tout autre matériel soit stérilisés entre les sites.

L'aménagement physique des laboratoires spécialisés en PCR est conçu pour prévenir la contamination, et ces laboratoires devraient avoir des procédures opérationnelles en place pour réduire efficacement la contamination croisée. Les laboratoires d'ADNe de grande qualité présentent les caractéristiques suivantes :

- un espace de laboratoire dédié à l'ADNe avec accès restreint et déplacements autorisés prescrits entre les salles/espaces du laboratoire;
- la séparation physique des processus critiques (p. ex. séparation de l'extraction de l'ADN et de l'espace aménagé pour la PCR);
- l'utilisation de postes de travail ou de hottes de PCR, un débit d'air unidirectionnel et un équipement spécialement consacré à l'ADNe;
- de bonnes pratiques de laboratoire, des procédures opérationnelles normalisées, des techniques de laboratoire rigoureuses et des protocoles de nettoyage stricts.

SECTION III : ANALYSE DES ÉCHANTILLONS D'ADNe – MÉTHODES DE LABORATOIRE

Sommaire de la section : Cette section renseigne sur la présentation de l'information cruciale tirée des protocoles d'extraction de l'ADN et d'analyse par qPCR pour la détection des EAE et EP. La détection des EAE et EP est souvent difficile parce qu'il peut y avoir une faible concentration d'ADN cible dans l'environnement (c.-à-d. que l'espèce est rare) et que la cible peut se trouver dans divers habitats.

Il est important de décrire les méthodes d'extraction de l'ADN parce que l'utilisation de méthodes différentes peut avoir une incidence sur la quantité d'ADNe extraite. La sous-section sur l'extraction de l'ADN présente les méthodes utilisées pour isoler et purifier l'ADN. Elle décrit et définit six éléments essentiels qu'il est important d'inclure dans les rapports sur l'extraction de l'ADN, comme le protocole de référence et les conditions d'entreposage de l'ADNe extrait.

Il est tout aussi important de déclarer les protocoles des test qPCR pour comprendre les propriétés de l'analyse et déterminer si la méthode d'application a été modifiée par rapport à un projet précédent, ce qui a une incidence sur la comparabilité des résultats et pourrait influencer sur le niveau de validation de l'analyse (encadré 7 et 8). La section E, Test qPCR, décrit les différentes méthodes de qPCR et l'importance de la validation de la qPCR. Elle définit également neuf éléments qui doivent être inclus dans tous les rapports sur les analyses qPCR, comme les réplicats techniques par échantillon. Une partie fondamentale de cette sous-section porte sur la détection de l'inhibition de la PCR, qui est particulièrement importante puisqu'un échantillon de qPCR inhibé peut entraîner la déclaration d'un faux négatif.

Une échelle de validation des analyses est présentée pour permettre aux gestionnaires de déterminer s'il est utile d'appliquer une analyse d'ADNe dans une zone d'étude. La détermination du niveau de validation d'une analyse améliorera la transparence des méthodes de laboratoire, la compréhension des limites de l'interprétation des résultats et la confiance générale dans les résultats d'ADNe. L'échelle de validation de l'analyse présentée comprend les propriétés permettant d'évaluer l'analyse effectuée aux différentes étapes des projets d'ADNe. Le niveau de validation approprié dépendra du but ultime et de l'utilisation des résultats. Les études exploratoires pourraient nécessiter moins de validation, et les études de l'ADNe à des fins d'application de la loi un niveau de validation plus strict.

Encadré 7. Qu'est-ce qu'un test qPCR?

La qPCR est une technique de laboratoire de biologie moléculaire fondée sur la réaction en chaîne de la polymérase (PCR). Les techniques de PCR sont utilisées pour augmenter le nombre de copies de la séquence d'ADN cible, ou l'amplifier, afin de pouvoir les visualiser et les mesurer. Dans la qPCR, l'amplification d'une séquence d'ADN cible, ou amplicon, est continuellement mesurée tout au long du processus de la PCR. Elle est différente de la PCR conventionnelle, qui amplifie simplement la séquence d'ADN cible qui est mesurée (quantifiée), selon différentes méthodes, après la fin du processus d'amplification. La qPCR détecte des concentrations plus faibles d'ADN plus précisément que la PCR conventionnelle, car les données sont recueillies en temps réel, fournissant l'information lorsque l'amplification de l'ADN cible commence et lorsque le doublement de l'ADN est le plus efficace et s'accumule à un taux constant. En revanche, les concentrations d'ADN mesurées une fois le processus d'amplification terminé peuvent afficher une plus grande variabilité entre les réplicats en raison des différences des propriétés cinétiques (p. ex. épuisement des réactifs de PCR) entre les réactions de la PCR au cours des dernières étapes du processus d'amplification.

Pour visualiser et mesurer l'ADN amplifié, un test qPCR utilise un colorant intercalant fluorescent (p. ex. vert SYBR) ou une sonde émettant une fluorescence (p. ex. Taqman) qui se lie à l'ADN cible. Pour diverses raisons, on privilégie habituellement la détection de l'ADNe à l'aide d'analyses qPCR fondées sur des sondes par rapport aux analyses qPCR basées sur des colorants. La qPCR comporte plusieurs cycles de réaction (généralement de 40 à 50) de changements de température. À chaque cycle de qPCR, la quantité d'amplicons double et, par conséquent, le signal fluorescent s'intensifie (figure 1). Lorsque la concentration d'ADNe est élevée (figure 1, ligne rouge), le nombre de cycles de qPCR nécessaires pour atteindre le seuil de détection de la fluorescence (figure 1, ligne bleue pointillée) et la valeur C_q correspondante est basse. Lorsque la concentration d'ADNe est faible (figure 1, ligne jaune), la valeur C_q correspondante est élevée, ce qui indique que l'ADN est détecté plus tard dans la réaction.

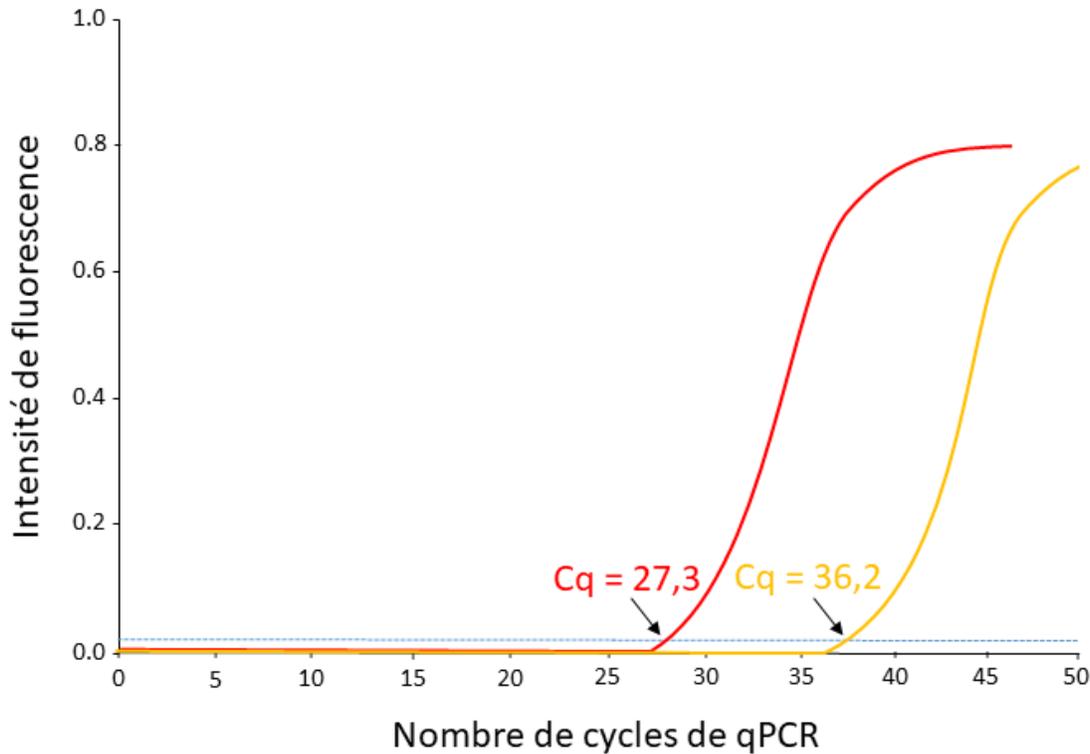


Figure 1. Schéma illustrant la relation entre l'intensité de la fluorescence et la concentration d'ADN cible (concentration d'ADN cible plus élevée et plus faible, lignes rouge et jaune, respectivement). L'intensité du signal fluorescent (axes verticaux) augmente au-dessus du seuil de détection (ligne bleue pointillée) à un nombre plus faible de cycles de qPCR (axes horizontaux) dans les échantillons où l'ADN est plus concentré. Le nombre de cycles de réaction et l'intensité du signal de fluorescence (en corrélation avec la concentration d'ADN) sont inversement proportionnels.

En général, on quantifie les concentrations inconnues d'ADN cible à partir d'échantillons d'ADNe à l'aide d'une courbe d'étalonnage (figure 2, ligne bleue) qui consiste en une série d'étalons ou de solutions contenant une concentration d'ADN précise et croissante (figure 2; STD 1 à 9). On reporte ensuite le résultat du cycle de quantification de l'échantillon d'ADNe sur la courbe d'étalonnage pour déterminer sa concentration d'ADN (figure 2, étoile noire). Il est à noter que les valeurs de Cq sont relativement variables pour les étalons contenant de faibles concentrations d'ADN comparativement à ceux contenant de fortes concentrations d'ADN, ce qui signifie que les mesures des échantillons d'ADN à faible concentration (Cq élevé) ne sont pas aussi précises que les valeurs de Cq faibles pour les réplicats d'étalon d'ADN et les échantillons d'ADNe. L'augmentation du nombre d'échantillons répétés d'ADN peut réduire la variance de la valeur Cq, ce qui est essentiel pour une détection fiable à de faibles concentrations d'ADNe.

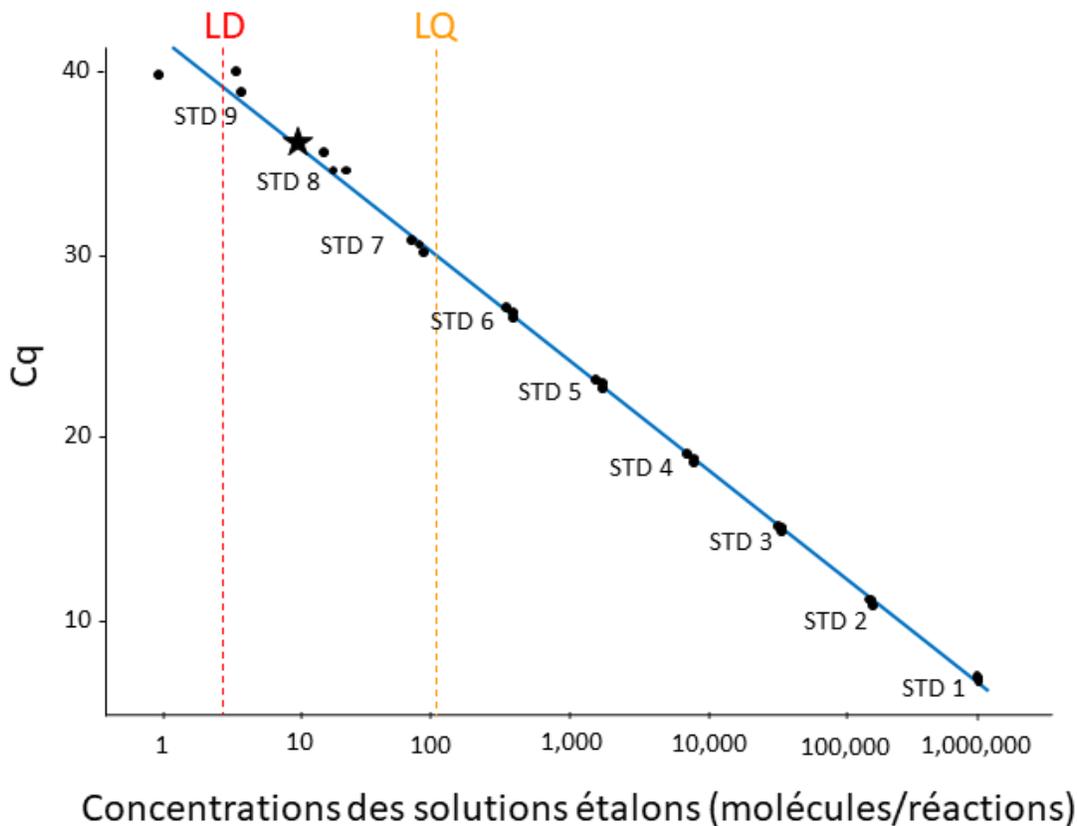


Figure 2. Courbe d'étalonnage (courbe standard) d'un test qPCR illustrant les résultats de solutions dont les concentrations d'ADN sont connues (cercles) et inconnues (étoiles). STD 1 à STD 9 représente une série de dilutions de concentrations d'ADN connues, d'élevées à faibles, respectivement. Le Cq (cycle de quantification) sur l'axe vertical est le cycle auquel le signal fluorescent est détectable par l'instrument de qPCR; il est tracé par rapport à la concentration d'ADN (à l'échelle logarithmique) sur l'axe horizontal. Il est courant d'obtenir jusqu'à 40 cycles de réaction; lorsqu'on utilise des cycles supplémentaires, les erreurs dans l'amplification par qPCR peuvent devenir plus fréquentes. On estime les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) de manière statistique en fonction de la variance entre les répliquats des étalons (voir les définitions des LD et des LQ dans le glossaire et Klymus et al. 2019 pour un exemple de calcul). L'échantillon dont la concentration est inconnue (indiqué par une étoile noire) a une valeur Cq de 36 et sa concentration étalon serait de 10 molécules par réaction. Il convient de noter que les détections inférieures à la LD peuvent être considérées comme des données qualitatives acceptables dans certains projets ayant une faible tolérance au risque pour les faux négatifs (voir l'encadré 10).

D. Extraction de l'ADN

Considérations générales : Il existe de nombreuses méthodes d'extraction de l'ADN (Goldberg et al. 2016), notamment des trousse d'extraction commerciales et des protocoles publiés fondés sur la séparation de phases et la précipitation de l'ADN (p. ex. CTAB/chloroforme, phénol/chloroforme). La récupération nette de l'ADNe peut varier dans les trousse commerciales d'extraction ou les méthodes et entre elles. Une méthode d'extraction de l'ADN est choisie en fonction de son efficacité à extraire et à concentrer l'acide nucléique d'un milieu d'échantillonnage (p. ex. échantillon environnemental, contenu intestinal), de sa capacité à atténuer l'inhibition de la PCR et de sa pertinence pour l'application en question. Le coût, la capacité de traitement,

l'infrastructure du laboratoire et l'expérience des analystes sont également pris en compte dans le choix des méthodes d'extraction de l'ADN. Il est recommandé d'utiliser et de consulter les procédures opérationnelles normalisées (PONs) pour les protocoles d'extraction de l'ADN et de réduire au minimum la contamination en laboratoire (voir l'encadré 6 pour plus d'information sur la façon de réduire au minimum la contamination).

D.1 Nom de la trousse commerciale ou du protocole : Indiquez le nom de la méthode d'extraction utilisée (c.-à-d. trousse commerciale, protocole publié ou interne).

D.2 Protocole de référence : Indiquez le protocole de la méthode d'extraction utilisée. Si vous avez utilisé une trousse commerciale, signalez toute modification apportée aux protocoles du fabricant. Si vous avez utilisé un protocole publié ou interne, annexe-le au rapport. S'il y a lieu, signalez les écarts qui se sont produits pour des échantillons à l'annexe 4.

D.3 Témoins d'extraction de l'ADN : Indiquez les types de témoins d'extraction de l'ADN utilisés et leur fréquence (p. ex. un témoin négatif et un témoin positif d'extraction par lot de 24 extractions).

D.4 Proportion de l'échantillon total : Indiquez quelle proportion de l'échantillon environnemental a été utilisée dans le processus d'extraction de l'ADN (p. ex. la moitié de la membrane filtrante, le poids des sédiments).

D.5 Volume d'éluion d'ADN : Indiquez le volume et le type de tampon utilisé pour recueillir l'ADN extrait.

D.6 Conditions d'entreposage de l'ADNe extrait : Décrivez les conditions d'entreposage des extraits d'ADN. Elles se situent généralement entre -20 et -80 °C pour prévenir la dégradation de l'ADN.

E. Test qPCR

Considérations générales : Un fournisseur de services d'ADNe peut utiliser des tests qPCR publiés ou des tests avec des droits exclusifs dont les protocoles ne sont pas divulgués. Dans un cas comme dans l'autre, il faut inclure des éléments critiques dans le modèle de rapport et l'annexe 3 pour permettre l'examen et l'interprétation objectifs des résultats. Il se peut que les tests publiés n'aient pas été entièrement validés, et il faut alors évaluer le niveau de validation de *tous* les tests (y compris de ceux qui sont publiés). Il est important de reconnaître que le niveau de validation du test est déterminé pour laboratoire spécifique, dans une région géographique déterminée et pour un type d'échantillon environnemental donné; si l'un ou l'autre de ces éléments change, les données de validation existantes du test ne seront pas entièrement applicables. Il est impératif que la spécificité du test soit vérifiée dans la région géographique où le test est utilisé et qu'elle soit rapportée ici. De plus, même si un protocole de test est suivi avec précision, la performance du test peut changer lorsqu'il est utilisé dans un nouvel environnement ou au fil du temps dans le même laboratoire.

E.1 Nom du test : Fournissez le nom et la référence du test, s'il est publié.

E.2 Type de test : Précisez le type de test (colorant intercalant ou sonde d'ADN). Voir l'encadré 7 pour plus de détails sur les types de tests. La combinaison de plusieurs tests utilisant de multiples marqueurs génétiques dans une seule réaction de qPCR (c.-à-d. un test qPCR multiplex) peut être une approche efficace pour détecter un ou plusieurs organismes en raccourcissant les temps de traitement et en réduisant l'utilisation de réactifs. Les tests en multiplexage doivent être validés pour limiter la concurrence entre les tests, qui pourrait en réduire la sensibilité (Gingera *et al.* 2017). Les tests multiplexés doivent être rigoureusement testés à toutes les étapes de la validation présentées dans l'encadré 8. Si vous utilisez un test qPCR multiplex, vous devez inclure l'information pour chaque test à l'annexe 3.

E.3 Niveau de validation du test : Indiquez le niveau de validation du test à l'aide du menu déroulant dans le modèle de rapport sur l'ADNe (voir l'encadré 8). Vérifiez que le niveau de validation du test indiqué ici correspond exactement au niveau de validation approprié pour la région géographique à laquelle il est appliqué (c.-à-d. que si vous utilisez un test de niveau 4 dans un nouvel environnement où des analyses approfondies sur le terrain et *in vitro* sur des espèces non ciblées co-occurentes n'ont pas été effectuées, vous devez la déclarer comme un test de niveau 3). Les fournisseurs de services d'ADNe doivent justifier le niveau de validation en décrivant comment ils ont évalué les critères minimaux du tableau 1. Il est recommandé ici que les gestionnaires mettent en œuvre des tests validés au moins au niveau 4, lorsqu'ils sont disponibles.

E.4 Données sur la spécificité : Décrivez les données sur la spécificité du test générées *de novo* ou déjà disponibles qui valident l'utilisation de ce test dans la zone d'étude. Il s'agit habituellement de tester des espèces étroitement apparentées qui peuvent coexister avec l'organisme cible pour s'assurer de l'absence de réactivité croisée du test avec des taxons non ciblés.

E.5 Dilution et volume de l'ADN utilisé : Indiquez si l'extrait d'ADN a été dilué avant l'analyse par qPCR et le facteur de dilution utilisé. Précisez le volume de l'échantillon d'ADN utilisé dans la réaction de qPCR. Il est possible d'utiliser différentes dilutions et différents volumes dans une étude pour limiter l'inhibition de la qPCR ou pour accroître la détection dans des zones précises. Si vous avez utilisé des dilutions ou volumes différents entre les échantillons, indiquez l'intervalle des dilutions et des volumes utilisés et donnez des renseignements précis pour chaque échantillon dans les résultats des données brutes à l'annexe 4.

E.6 Témoins positifs et négatifs du test qPCR : Indiquez les types de témoins et leur fréquence (p. ex. un témoin positif de la qPCR en trois exemplaires dans une plaque de 96 puits).

E.7 Réplicats techniques par échantillon : Indiquez le nombre de réplicats techniques (c.-à-d. les réplicats de qPCR analysés à partir du même extrait d'ADNe) par échantillon.

E.8 Essais d'inhibition : Donnez des détails sur l'approche utilisée pour détecter l'inhibition du test qPCR (encadré 9). Il est important de détecter une inhibition possible dans une nouvelle zone d'échantillonnage ou lors de l'utilisation d'une nouvelle méthode d'échantillonnage (c.-à-d. tenir compte des types de substrats comme l'argile et d'autres facteurs environnementaux qui peuvent altérer la quantité d'ADN disponible dans les relevés d'ADNe).

E.9 Nombre de cycles du test qPCR : Indiquez le nombre de cycles utilisés dans la réaction du test qPCR.

Encadré 8. Niveau de validation du test et interprétation des résultats

L'importance de valider les méthodes fondées sur l'ADNe avant leur mise en œuvre est bien reconnue (Sepulveda *et al.* 2020c); toutefois, le terme « validation » est utilisé de façon très générale. Il est nécessaire de l'étoffer pour permettre aux gestionnaires d'évaluer si un test particulier répond à leurs besoins et comment en interpréter les résultats. À cette fin, des experts européens du réseau DNAqua-Net ont mis au point une échelle de validation des tests d'ADNe et un guide d'interprétation des résultats (Leese *et al.* 2016; Thalinger *et al.* 2021) (figure 3).

L'échelle de validation des tests d'ADNe englobe l'ensemble des étapes réalisées pour détecter l'ADN d'une espèce. De ce fait, la validation du test ne comprend pas seulement le test qPCR, mais aussi tous les éléments du test, de l'échantillonnage à l'interprétation des résultats. Ainsi, il est essentiel que les éléments sur le terrain de la validation des tests soient effectués dans un emplacement géographique, un type d'écosystème et un substrat appropriés compte tenu de l'utilisation prévue du test pour la détection des EAE ou EP. Cela signifie que même si un test a été validé à un niveau particulier dans une région ou un emplacement géographique précis, il peut ne pas avoir le même niveau de validation dans une autre région. Dans ces cas, une validation supplémentaire peut s'imposer, comme la vérification expérimentale de la spécificité et de la sensibilité du test dans un nouvel emplacement géographique ou un nouveau substrat. Il est impératif qu'un fournisseur de services d'ADNe dans une région géographique donnée respecte strictement l'ensemble des étapes pour qu'un niveau de validation puisse être atteint. Cela souligne l'importance des procédures opérationnelles normalisées et de l'interprétation correcte des résultats compte tenu du niveau de validation du test.

L'échelle de validation des tests d'ADNe (figure 3) permet de classer les tests en cinq niveaux en fonction de leur précision et de leur sensibilité pour la détection de l'ADNe ciblé, et d'indiquer l'interprétation possible des résultats pour chaque niveau de validation. La confiance dans le rendement d'un test et, par conséquent, la capacité de conclure à la présence ou à l'absence de l'ADNe ciblé s'améliore le long de l'échelle. Par exemple, le niveau 1 valide la détection par qPCR de l'ADN de l'espèce cible, tandis que le niveau 2 confirme que cette détection est propre à l'espèce. Cependant, pour ces deux niveaux, seules les validations *in silico* (test de spécificité par ordinateur; niveau 1) et *in vitro* (test qPCR avec un extrait d'ADN de l'espèce ciblé et l'espèce étroitement apparentée; niveau 2) ont été effectuées; aucun échantillon environnemental n'a été analysé pour valider le rendement du test dans des conditions naturelles (*in situ*). Par conséquent, il est impossible de déterminer si l'ADNe ciblé est présent ou non en utilisant un test de niveau 1 ou 2; toutefois, le niveau 2 donne une première indication de la spécificité. Les analyses des niveaux 3 à 5 ont été validées aux étapes de l'échantillonnage à l'interprétation des résultats et peuvent donc être utilisées pour conclure à la présence de l'ADNe ciblé dans l'échantillon. Le séquençage de l'ADN peut permettre de confirmer la présence de l'ADN ciblé pour les tests aux niveaux 3 à 5, mais il ne peut pas déterminer si cet ADN provient de l'échantillon ou de la contamination, de sorte qu'il est essentiel d'utiliser des témoins négatifs. Bien qu'un test de niveau 3 ne permette pas de conclure à l'absence de l'ADNe ciblé, une telle conclusion est possible avec un test de niveau 4 ou 5. La réplication pendant l'échantillonnage peut servir à accroître la confiance dans les résultats pour conclure à l'absence de l'ADNe aux niveaux 4 et 5. Les critères minimaux nécessaires pour atteindre un niveau donné de validation sont présentés dans le tableau 1 (Thalinger *et al.* 2021).

La détermination du niveau de validation du test est habituellement itérative, la certitude dans la performance du test augmentant dans le temps avec les preuves accumulées et l'utilisation à grande échelle. Quelques mois peuvent être nécessaires pour atteindre

le niveau 2, plusieurs années pour atteindre le niveau 3 et plus encore pour atteindre le niveau 4 ou 5. Ainsi, un niveau de validation donné n'est pas nécessairement un paramètre statique – plus on utilise un test, plus on a confiance en sa performance. Les analyses peuvent être constamment mises à l'essai à mesure que les technologies et les stratégies d'échantillonnage continuent de s'améliorer.

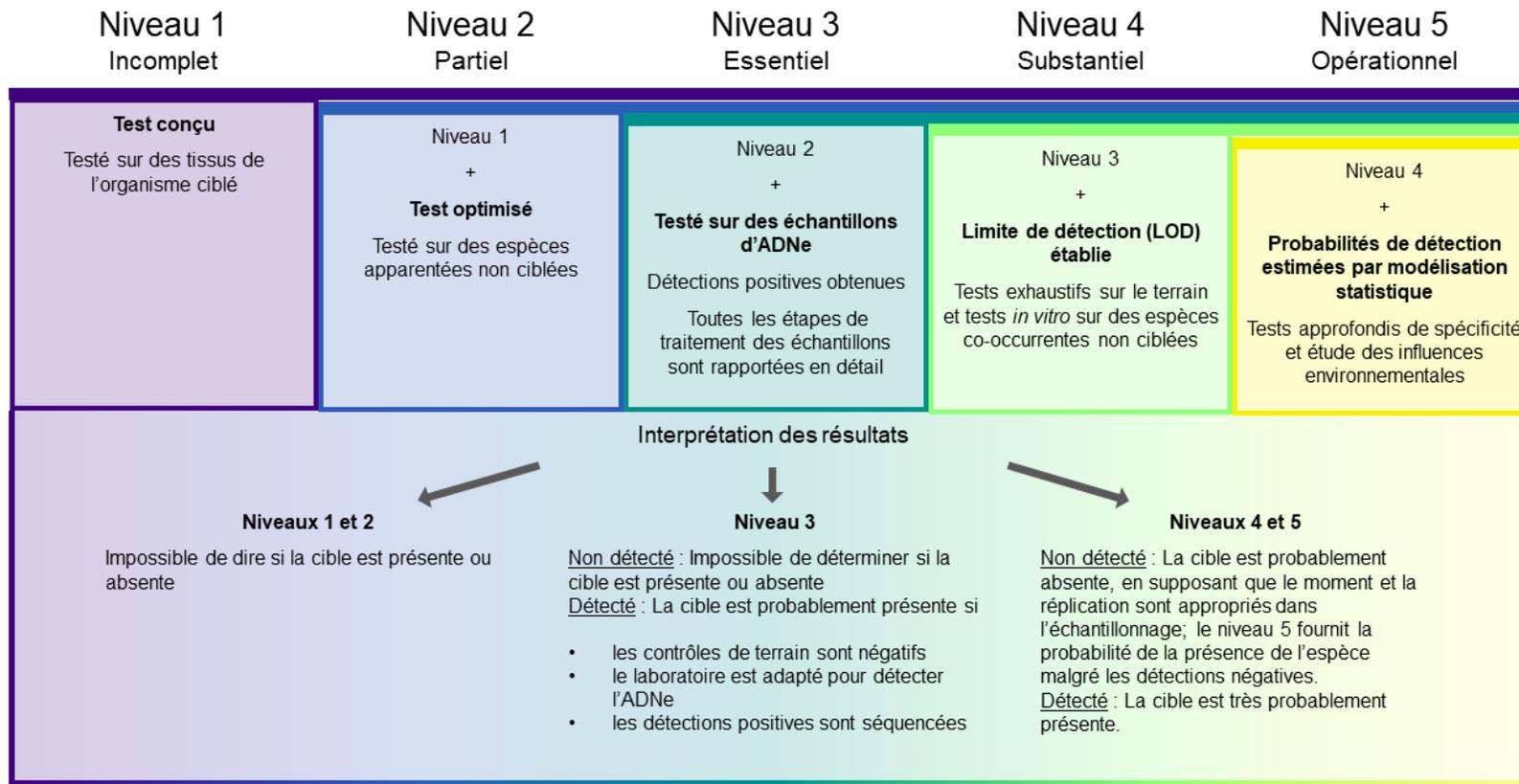


Figure 3. Une échelle de validation à cinq niveaux a été élaborée par Thalinger et al. 2021 pour faciliter l'évaluation des tests d'ADNe et l'interprétation appropriée des résultats. Pour chacun des niveaux, les principales réalisations du processus de validation et l'interprétation appropriée des résultats sont fournies. Voir les critères minimaux pour chaque niveau dans le tableau 1.

Tableau 1. Critères minimaux pour chacun des cinq niveaux de validation du test (présentés dans les « blocs de variables » sur la figure 3) qui doivent être remplis pour qu'un test atteigne un niveau de validation donné.

Niveau de validation	Blocs de variables	Critères minimaux
Niveau 1	test <i>in silico</i>	espèce ciblée
	analyse de tissus de l'espèce ciblée	tissus de l'espèce ciblée
	réaction en chaîne de la polymérase (PCR) de tissus de l'espèce ciblée	séquence de l'amorce (et de la sonde)
Niveau 2	rapport complet sur les conditions de la PCR	volume de l'extrait d'ADN dans la PCR
	tests <i>in vitro</i> sur des espèces non ciblées étroitement apparentées	tous les tests <i>in vitro</i> sur des espèces non ciblées
Niveau 3	méthode d'extraction effectuée sur les échantillons d'ADNe	méthode d'extraction
	concentration de l'ADNe provenant de l'échantillon environnemental	type de filtre ou produits chimiques de précipitation
	détection obtenue à partir d'échantillons environnementaux	détection à partir d'un échantillon environnemental (habitat artificiel ou naturel)
Niveau 4	limite de détection (LD)	LD déterminée
	analyses exhaustives sur le terrain d'échantillons environnementaux	plusieurs emplacements ou plusieurs échantillons
	tests <i>in vitro</i> sur des espèces non ciblées co-occurentes	tous les tests <i>in vitro</i> avancées
Niveau 5	analyses exhaustives de spécificité	espèces non co-occurentes/étroitement apparentées vérifiées à partir des tests <i>in silico</i>
	estimation de la probabilité de détection par modélisation statistique	tous les efforts visant à estimer la probabilité de détection
	compréhension des facteurs écologiques et physiques qui influencent l'ADNe dans l'environnement	tous les facteurs influant sur l'ADNe dans l'environnement analysé

Encadré 9. Inhibition de la PCR

L'inhibition de la PCR se produit lorsque des substances ou des produits chimiques présents dans l'échantillon d'ADNe empêchent l'amplification ou réduisent l'efficacité de l'amplification de l'ADN pendant la PCR. L'inhibition de la PCR peut mener à conclure à une détection négative à partir d'un échantillon contenant l'ADN ciblé (faux négatif). L'inhibition de la PCR peut être problématique dans les échantillons aquatiques et terrestres en raison de facteurs connus (p. ex. substances humiques; voir Schrader *et al.* 2012) ou inconnus.

Pour tester l'inhibition de la PCR, on ajoute une concentration connue d'une séquence d'ADN, différente de la séquence ciblée du test qPCR, appelée contrôle positif interne (CPI; voir le glossaire), à l'échantillon (« enrichi ») pour déterminer si l'amplification progresse comme prévu. S'il y a des preuves d'inhibition (c.-à-d. que les résultats du test qPCR indiquent des concentrations du CPI plus faibles que prévu étant donné la quantité de CPI ajoutée à la réaction de qPCR), il faut la corriger avant de pouvoir analyser les échantillons d'ADNe et les interpréter de façon fiable. Il existe de nombreuses options pour atténuer les problèmes d'inhibition, y compris la dilution des extraits d'ADNe, la modification des trousseaux commerciaux d'extraction d'ADN, la modification des trousseaux commerciaux de qPCR ou l'utilisation de trousseaux commerciaux d'élimination des inhibiteurs.

SECTION IV : SOMMAIRE DES RÉSULTATS D'ADNe

Sommaire de la section : Cette section fournit des informations sur la façon de présenter et d'interpréter les résultats d'ADNe. Elle se compose de deux sous-sections : la présentation des résultats des témoins et celle des résultats d'ADNe. Il est important de présenter les résultats des témoins et des échantillons d'ADNe, car une communication ouverte entre les fournisseurs de services et les utilisateurs finaux permet une compréhension plus claire lors de l'interprétation de ces résultats, ce qui améliore la crédibilité de l'utilisation de l'ADNe. À l'heure actuelle, il n'y a pas de critères établis pour évaluer les témoins, de sorte que la transparence dans la communication des résultats est essentielle pour interpréter les résultats. Pour évaluer la qualité et la crédibilité des résultats des échantillons, il faut analyser et évaluer plusieurs types de témoins positifs et négatifs. Dans la première sous-section, quatre éléments clés doivent être inclus dans la présentation des résultats des témoins. Toute indication de contamination doit être signalée. La deuxième sous-section, qui porte sur la présentation des résultats d'ADNe, décrit six éléments (dont trois sont facultatifs) à inclure dans cette déclaration, comme les résultats de la LD calculée et des résultats du test qPCR ayant fait l'objet d'une assurance de la qualité et d'un contrôle de la qualité (AQ/CQ). Il est précisé dans cette sous-section que toutes les sections qui la précèdent doivent être remplies pour répondre aux exigences en matière de présentation. Si toutes les sections sont remplies, le test qPCR peut être interprété pour déterminer la détection de l'ADNe.

On recourt couramment à deux méthodes pour améliorer la fiabilité de l'interprétation des détections de l'ADNe : les arbres décisionnels de détection et les approches statistiques. Les arbres décisionnels sont actuellement plus largement utilisés que les approches statistiques; ainsi, aux fins du présent document, seul un exemple d'arbre décisionnel sera présenté. À l'heure actuelle, l'utilisation d'approches statistiques est relativement nouvelle et, par conséquent, il existe moins d'exemples de leur application dans les études d'ADNe. Toutefois, elles évoluent rapidement et deviendront probablement plus courantes. La ou les méthodes utilisées doivent être clairement définies dans le modèle de rapport pour les gestionnaires des EAE ou EP afin que l'interprétation de la détection de l'ADNe soit plus facile à comprendre. Étant donné que l'interprétation des données est propre à une espèce ou à un écosystème, il est conseillé aux utilisateurs finaux de consulter des experts en ADNe, des écologistes et d'autres experts pertinents

au cas par cas afin d'optimiser la détection des espèces et de discuter des incertitudes dans l'interprétation des résultats d'ADNe.

F. Présentation des résultats des témoins

Considérations générales : L'objectif ici est d'assurer la transparence et de définir clairement la façon dont les résultats et les témoins ont été évalués, afin de faciliter l'interprétation et la comparaison des résultats sans limiter les nouvelles idées dans ce domaine de recherche en pleine évolution.

Avant d'interpréter les résultats des échantillons d'ADNe, il faut évaluer les témoins positifs et négatifs pour déterminer la fiabilité et la qualité des résultats des échantillons. Il n'y a pas encore de consensus clair sur les critères d'évaluation des témoins. Plusieurs types de témoins positifs et négatifs auront été analysés dans un projet (voir les sections précédentes). Toute indication de contamination doit être signalée, et si on procède à l'interprétation des échantillons d'ADNe, il faut la justifier pleinement et expliquer tous les impacts potentiels sur les objectifs du projet (voir l'encadré 6 pour plus de détails).

F.1 Critères pour déterminer si les témoins ont réussi ou échoué : Fournissez les critères utilisés pour déterminer si les témoins positifs et négatifs ont réussi ou échoué. Si les critères diffèrent d'un témoin à l'autre, donnez des renseignements sur chacun séparément et indiquez les différences entre les différents types de témoins (p. ex. terrain, filtration, extraction, test qPCR, inhibition).

F.2 Résultats des témoins positifs : Indiquez le nombre (et le total) de témoins positifs qui ont réussi. Si vous avez utilisé différents types de témoins positifs, présentez-les séparément.

F.3 Résultats des témoins négatifs : Indiquez le nombre (et le total) de témoins négatifs qui ont réussi. Si vous avez utilisé différents types de témoins négatifs, présentez-les séparément. Il convient de noter que les seuils de détection des témoins négatifs doivent être justifiés et établis *a priori*.

F.4 Témoins qui ont échoué : Pour tous les témoins qui ont échoué, expliquez pourquoi on peut encore tenir compte des résultats, y compris le type de témoins qui a échoué et l'effet sur le niveau de certitude et les considérations dans l'interprétation des résultats.

G. Présentation des résultats d'ADNe

Considérations générales : Il faut remplir toutes les sections jusqu'à ce point pour satisfaire aux exigences en matière de présentation des présentes lignes directrices. Il se peut que le fournisseur de services d'ADNe ne complète pas le rapport au-delà de la présentation des résultats du test qPCR ayant fait l'objet d'AQ/CQ (G.2) et de l'approvisionnement des données du test qPCR (annexe 4), *auquel cas il ne remplira pas les sections G.4 à G.6*. Toutefois, si le fournisseur de services d'ADNe participe à l'interprétation des résultats d'ADNe, ces sections sont obligatoires.

G.1 LD calculée : Présentez la LD du test qPCR déterminée expérimentalement et décrivez comment elle a été calculée (c.-à-d. donnez la valeur Cq et la concentration [de préférence des copies de la cible par réaction ou par volume d'eau échantillonné] associées à la LD).

G.2 Résultats de la qPCR ayant fait l'objet d'AQ/CQ : Indiquez le nombre total de répliqués de qPCR et le nombre qui a produit une valeur de Cq *égale ou supérieure* à la LD (voir G.1) après l'évaluation des témoins (voir l'encadré 10). Par exemple, pour 10 sites comptant chacun 2 stations, un échantillon par station et deux répliqués de qPCR par échantillon, il faudrait présenter 40 répliqués de qPCR.

G.3 Autres résultats de la qPCR : Indiquez le nombre total global de réplicats de qPCR et le nombre qui a produit une valeur de C_q inférieure à la LD (voir G.1) après l'évaluation des témoins (voir l'encadré 10).

G.4 Détermination des résultats au niveau de l'échantillon (facultatif) : Définissez les critères ou l'approche statistique utilisés pour déterminer si de l'ADNe a été détecté au niveau de l'échantillon (voir l'encadré 10). Indiquez le nombre total d'échantillons et le nombre qui a donné un résultat « détecté ».

G.5 Détermination des résultats au niveau de la station (facultatif) : Définissez les critères ou l'approche statistique utilisés pour déterminer si de l'ADNe a été détecté au niveau de la station (voir l'encadré 10). Indiquez le nombre total de stations et le nombre qui a donné un résultat « détecté ».

G.6 Détermination des résultats au niveau du site (facultatif) : Définissez les critères ou l'approche statistique utilisés pour déterminer si de l'ADNe a été détecté au niveau du site (voir l'encadré 10). Indiquez le nombre total de sites et le nombre qui a donné un résultat « détecté ».

Encadré 10. Interprétation des résultats de la qPCR pour la détection de l'ADNe

Les résultats d'ADNe sont difficiles à interpréter parce que l'ADNe des espèces rares peut être détecté dans un petit nombre d'échantillons d'un site ou un petit nombre de réplicats de qPCR d'une zone d'étude. Il n'y a pas de consensus sur la façon d'évaluer les résultats de qPCR à partir des témoins et des échantillons, mais l'évaluation des témoins et des échantillons devrait refléter la tolérance au risque de l'étude. Les différents utilisateurs finaux auront des tolérances au risque différentes et peuvent de ce fait utiliser des approches différentes pour traduire les résultats bruts de qPCR en résultats finaux de la détection de l'ADNe. Ces approches utilisent la réplication à plusieurs niveaux hiérarchiques (p. ex. qPCR, échantillon, station, site) pour améliorer la fiabilité de la détection de l'ADNe (voir l'encadré 4).

La figure 4 illustre *un exemple* de la façon dont on pourrait analyser les résultats de la qPCR à l'aide d'un arbre décisionnel. Elle présente les principaux éléments d'un arbre décisionnel et ne se veut pas une norme pour une étude donnée de détection de l'ADNe. On peut utiliser des seuils différents de ceux appliqués sur la figure 4 pour déterminer si l'ADNe a été détecté dans un échantillon, une station et un site; en effet, les critères utilisés dans une étude d'ADNe dépendront du plan de l'étude, de ses objectifs et des organismes cibles examinés. Dans cet exemple, l'analyse devait être validée au moins au niveau 4 (parce que la LD est requise, voir la figure 3), et seuls les réplicats de qPCR dont les résultats étaient égaux ou supérieurs à la LD ont été pris en compte dans l'arbre décisionnel.

Lors de l'examen des résultats de qPCR, on se trouve face à une situation difficile lorsque les seuls résultats non négatifs d'une étude d'ADNe ne répondent pas aux critères de détection minimaux. Un exemple serait quand les échantillons d'ADNe ne contiennent qu'un petit nombre de réplicats d'échantillons qui donnent une valeur de C_q , et que les critères de détection minimaux ont été fixés à un niveau plus élevé. Un autre exemple serait lorsque les seuls résultats non négatifs d'une étude sont tous inférieurs à la LD, et que la LD a été utilisée comme critère de détection minimum. Il est important de souligner que les résultats inférieurs à la LD signifient que ces signaux ne sont pas très répétables, mais ils ne sont pas nécessairement faux. La détermination de la façon d'interpréter de tels résultats doit tenir compte des objectifs de l'étude, du poids de la preuve fondé sur l'effort d'échantillonnage/de suivi et d'autres renseignements biologiques et écologiques, ainsi que de la tolérance au risque de la gestion, et devrait inclure la consultation d'experts. Il ne faut pas ignorer les résultats qui sont difficiles à résoudre, car ils pourraient être

révélateurs d'une constatation réelle ou fournir des indications utiles qui pourraient orienter un futur plan de l'étude ou la révision des critères de détection.

En tant que solution de rechange aux arbres décisionnels utilisant des critères de détection adaptables, les approches statistiques fournissent une valeur quantitative pour inférer la fiabilité des détections de l'ADNe. Les simulations fondées sur ces modèles montrent comment la puissance statistique de détection de l'ADNe varie selon les niveaux de réplication (Ficetola *et al.* 2016; Lahoz-Monfort *et al.* 2016). Il convient de noter que les probabilités de détection ne peuvent être calculées qu'une fois le projet terminé; elles peuvent donc servir à guider les plans de projets pour les efforts de rééchantillonnage ultérieurs ou pour indiquer la nécessité d'exécuter un plus grand nombre de réplicats de qPCR.

Que l'on utilise une approche fondée sur un arbre décisionnel ou une modélisation statistique pour détecter l'ADNe, il est essentiel de décrire et de communiquer clairement les méthodes et critères appliqués dans le plan d'étude et l'analyse afin que les gestionnaires des EAE et EP comprennent comment les résultats d'ADNe ont été générés et interprétés. Il est essentiel de produire et de fournir des renseignements et des avis défendables et fiables sur l'ADNe pour que les utilisateurs finaux aient l'information nécessaire pour prendre des décisions fondées sur des éléments probants tout en renforçant la confiance dans l'utilisation de l'ADNe comme outil précieux pour le suivi des organismes aquatiques d'intérêt pour la gestion. De plus, selon l'étude, on peut chercher à corroborer les résultats d'ADNe, par exemple, au moyen d'une autre méthode d'échantillonnage ciblée aux sites de détection de l'ADNe, du rééchantillonnage, de tests qPCR supplémentaires ou du séquençage de l'ADN d'un sous-ensemble de produits de la qPCR.

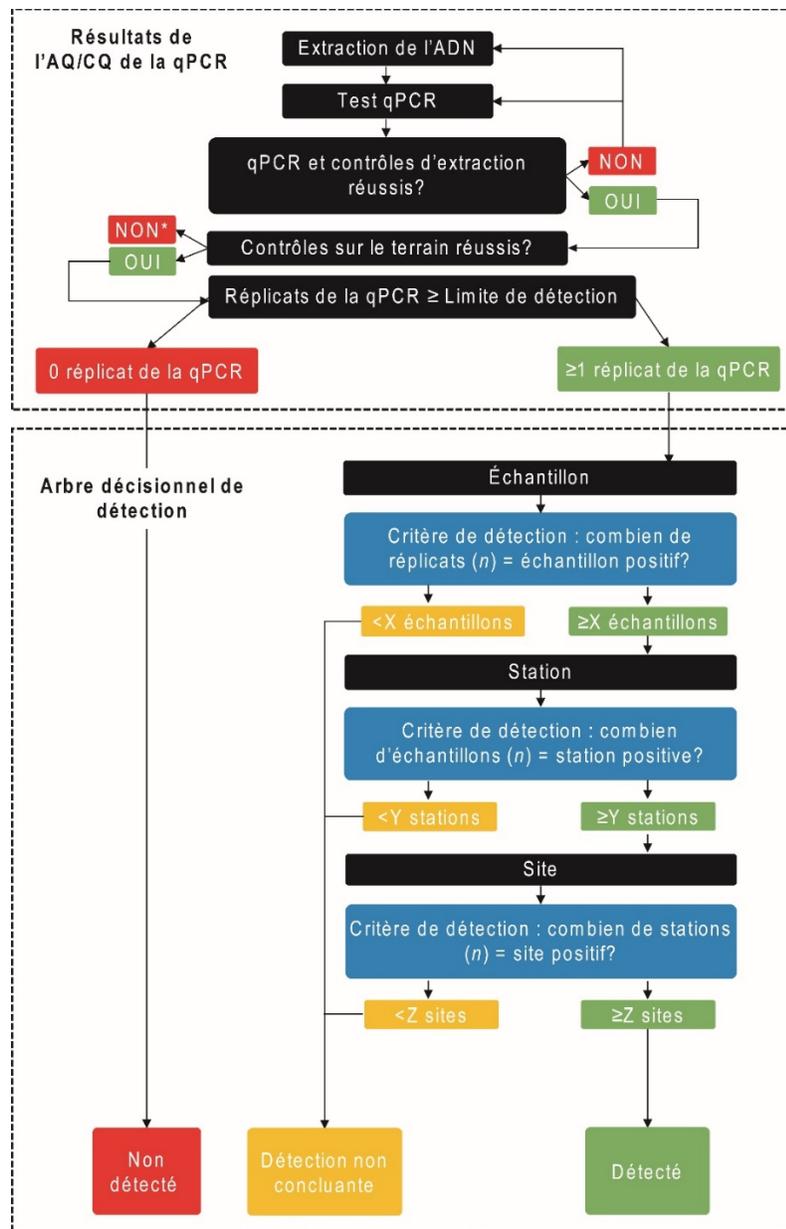


Figure 4. Exemple d'interprétation des résultats du qPCR de l'ADNe. Dans la boîte en pointillés du haut, les résultats finaux de la qPCR sont générés par la vérification des témoins. La boîte en pointillés du bas est un arbre décisionnel de détection, dans lequel les critères appliqués sont variables (comme l'indiquent X, Y et Z) et peuvent ou non différer pour chaque niveau, car ils seront établis en fonction des objectifs de l'étude et de la tolérance au risque de l'utilisateur final. Il convient de noter qu'il ne faut en aucun cas utiliser le format de l'arbre décisionnel de détection ou les critères de détection énoncés dans cet exemple comme des étalons pour les études de détection de l'ADNe. Cet exemple est valable uniquement pour les tests validés de niveau 4 ou 5 (figure 3) puisque la LD est requise. Dans cet exemple, on utilise le terme « non concluante » puisque certains réplcats de qPCR ont des valeurs supérieures à la LD, mais ne permettent pas de satisfaire à un critère au niveau de l'échantillon, de la station ou du site.

Remarque : Le symbole * qui est associé aux témoins sur le terrain qui n'ont pas réussi, indique la nécessité d'une discussion entre l'utilisateur final et les fournisseurs de services d'ADNe. Il y a de nombreux résultats possibles sur la façon de procéder dans ce cas, et cela dépendra des objectifs du projet et de la tolérance au risque de l'utilisateur final.

H. Observations finales

H.1 Avertissement : Donnez des renseignements supplémentaires qui n'ont pas déjà été fournis et qui pourraient être pertinents pour les résultats et l'interprétation ultérieure. Par exemple, décrivez les problèmes rencontrés pendant l'échantillonnage, le prélèvement, la conservation, le transport, l'entreposage des échantillons d'ADNe et le travail en laboratoire, de même que leur incidence potentielle sur les résultats.

H.2 Sommaire de la détection de l'ADNe : Fournissez un sommaire des résultats d'ADNe. Il peut s'agir d'un tableau ou d'une carte annexée, qui devrait être résumé au niveau approprié pour l'étude (p. ex. site, rivière, série chronologique) et le plan d'échantillonnage connexe. Ce sommaire doit aider l'utilisateur final à évaluer le nombre de détections d'ADNe (tel qu'indiqué à la section G) et la façon dont elles étaient distribuées dans l'espace ou le temps.

H.3 Recommandations futures : Fournissez des recommandations ou des modifications pour les travaux futurs, y compris des méthodes pour réduire les défis logistiques ou expérimentaux; améliorer l'efficacité des laboratoires; prévenir la contamination; optimiser le choix de l'équipement ou des réactifs, etc.

Conclusions

Les présentes lignes directrices fournissent des renseignements essentiels pour la conception, la réalisation, la présentation et l'interprétation des études d'ADNe, notamment le plan d'étude, l'échantillonnage de l'ADNe dans divers substrats, le traitement des échantillons après la collecte, les méthodes de laboratoire, les stratégies d'interprétation des résultats de la qPCR pour déterminer la présence ou l'absence de l'ADN ciblé, et ce que les utilisateurs finaux gagneront à répéter l'étude dans le temps, l'espace et les laboratoires. Le modèle de rapport qui les accompagne permet aux gestionnaires de déterminer l'information qui est cruciale pour démontrer l'intégrité scientifique et donner confiance dans le projet et les résultats de l'ADNe. En fin de compte, ces documents visent à améliorer les techniques fondées sur l'ADNe et à améliorer l'utilisation des résultats par les gestionnaires des EAE et EP. Il est important de reconnaître que la fiabilité des détections est liée au plan d'échantillonnage et à la mesure dans laquelle il permettait de bien catégoriser la détection de l'ADNe des organismes d'intérêt.

Malgré les avantages des méthodes de détection d'ADNe, l'un des principaux inconvénients est que les détections positives de l'ADNe n'indiquent pas directement la présence d'un organisme vivant local et que les non-détections de l'ADNe ne confirment pas l'absence d'un organisme. Il faut donc interpréter les résultats de l'ADNe dans le contexte des objectifs de gestion, car l'ampleur et le sens des tolérances au risque peuvent varier selon les objectifs de l'étude. En dépit des preuves de plus en plus nombreuses montrant que l'ADNe est un outil robuste pour détecter la présence ou l'absence d'une espèce, il n'existe malheureusement pas de « solution miracle » pour interpréter les résultats de test qPCR de l'ADNe compte tenu des divers objectifs, plans d'échantillonnage et niveaux de validation des tests, de l'absence de normes ou de lignes directrices largement reconnues pour produire ou interpréter les données sur l'ADNe, ainsi que de la grande variété des organismes ciblés. Il est recommandé d'inclure dans l'interprétation des résultats d'ADNe une discussion entre les gestionnaires et les scientifiques qui tiendra compte de toute l'information biologique disponible sur l'espèce, en consultation avec d'autres experts pertinents, le cas échéant. La présentation uniforme des résultats d'ADNe peut contribuer à accroître la confiance et la fiabilité dans la détection d'ADNe des EAE et EP; nous recommandons en conséquence que les gestionnaires de ces espèces utilisent les lignes directrices et le modèle de rapport sur l'ADNe et travaillent en étroite collaboration avec les fournisseurs de services d'ADNe et d'autres experts pertinents, selon un plan de communication établi, tant avant le début d'un projet que pendant le projet et l'interprétation des résultats.

ACRONYMES

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNe : ADN environnemental

ARNe : ARN environnemental

ARN : acide ribonucléique

AQ/CQ : assurance de la qualité et contrôle de la qualité

BHQ : black hole quencher^{MC}

BPL : bonnes pratiques de laboratoire

CNEAE : Comité national sur les espèces aquatiques envahissantes

cPCR : PCR conventionnelle

CPI : contrôle positif interne

CRISPR/Cas : courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées et protéines associées aux CRISPR

CSA : Canadian Standards Association

Ct : cycle seuil

CTAB : bromure de cétrimonium

Cq : cycle de quantification

ddPCR : réaction en chaîne par polymérase gouttelettes digitales

EAE : espèce aquatique envahissante

EP : espèces en péril

HTS : séquençage à haut débit

LD : limite de détection

LQ : limite de quantification

MGB : ligand du petit sillon

NGS : séquençage de nouvelle génération

pb : paire de bases

PCR : réaction en chaîne de la polymérase

PISCeS : Pathway to Increase Standards and Competency of eDNA Surveys

PON : procédure opérationnelle normalisée

qPCR : PCR quantitative

STD : étalon

TSM : témoin sans matrice

GLOSSAIRE

Abiotique : facteurs physiques, facteurs chimiques et autres facteurs environnementaux non vivants.

ADN environnemental (ADNe) : ADN extrait d'échantillons environnementaux (p. ex. eau, biofilms, air, sédiments, contenu intestinal, fèces) et analysé pour déduire la présence ou l'absence d'ADN des organismes ciblés.

Aliquote : portion d'une quantité totale d'une solution ou d'une suspension.

Amorces : courtes séquences d'ADN simple brin fabriquées pour correspondre à une séquence spécifiée d'un organisme ou d'un groupe taxonomique, et utilisées pour lancer le processus de PCR.

Amorce spécifiques: amorce conçue pour amplifier une région génétique unique propre à une seule espèce.

Amorce universelle : amorce conçue pour amplifier une région génétique hautement conservée entre plusieurs taxons.

Amplicon : segment d'ADN ou d'ARN qui est le produit d'événements de réplication. Résultat de l'utilisation de méthodes d'amplification telles que la PCR.

Approches communautaires : méthode de plan d'étude qui utilise des amorces universelles pour détecter un groupe focal d'organismes donné, généralement par métabarcoding d'ADN.

Approche de détection monospécifique : voir méthodes ciblées.

Approches semi-ciblées : voir approches communautaires.

ARN environnemental (ARNe) : ARN extrait d'échantillons environnementaux (p. ex. eau, biofilms, air, sédiments, contenu intestinal, matières fécales) et analysé pour déduire la présence ou l'absence de l'ARN des organismes ciblés.

Biais d'amplification (biais d'amorce) : différences d'efficacité d'amplification par PCR entre différents ADN ciblés (p. ex. différentes espèces) de sorte que pendant chaque cycle de PCR, les espèces seront amplifiées à des vitesses différentes en fonction de leur affinité avec les amorces de PCR utilisées. Il peut s'agir d'un problème courant en métabarcoding lorsqu'on utilise des amorces universelles.

Biodiversité : variabilité des organismes vivants de toute origine, notamment des écosystèmes terrestres et aquatiques - y compris marins - et des complexes écologiques qu'ils forment, notamment la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes.

Bioinformatique : développement et utilisation de logiciels pour étudier les séquences génétiques et les protéines.

Biotique : se rapporte aux organismes vivants ou en résulte, surtout dans leurs liens écologiques.

Blanc d'échantillon : échantillon témoin négatif inséré dans les étapes de l'analyse d'ADNe. Le but principal des blancs d'échantillon est de retracer les sources de la contamination introduite artificiellement. On peut déduire la source de contamination introduite sur le terrain ou en laboratoire en comparant les résultats de différents blancs d'échantillon (p. ex. blanc d'échantillon de terrain, blanc d'échantillon de l'extraction).

- **Blanc d'extraction** : type d'échantillon témoin négatif inclus pendant le processus d'extraction de l'ADN. Un blanc d'extraction est manipulé de la même façon que tous les autres échantillons pendant le processus d'extraction. Les résultats d'un blanc d'extraction montrent les sources de contamination provenant dans les analyses en laboratoire.

-
- **Blanc de terrain** : type de témoin négatif traité sur le terrain qui est théoriquement exempt de tout ADN. Un blanc de terrain se compose habituellement d'eau exempte d'ADN qui est manipulé de la même façon que tous les autres échantillons (à l'exception du prélèvement d'ADNe) pour tenter de caractériser toute contamination potentielle. Les résultats d'un blanc de terrain, s'ils sont positifs, mettent en évidence les sources potentielles de contamination.
 - **Blanc de filtration en laboratoire** : type de témoin négatif utilisé lorsque les échantillons sont filtrés en laboratoire, permettant de différencier la contamination qui s'est produite sur le terrain (c.-à-d. pendant le prélèvement des échantillons ou la manipulation des échantillons provenant de diverses stations et de divers sites) de celle qui a eu lieu pendant le processus de filtration.
 - **Blanc de qPCR** : type de témoin négatif utilisé dans la qPCR qui comprend toutes les composantes de réaction de PCR, mais pas d'ADN. Aussi appelé témoin sans matrice (TSM). L'amplification dans un blanc de qPCR indique que la contamination s'est produite à l'étape de la qPCR.

Bonnes pratiques de laboratoire (BPL) : système de contrôle de la qualité composé de contrôles et conditions de gestion pour les laboratoires et les organismes de recherche afin d'assurer l'uniformité, la cohérence, la fiabilité, la reproductibilité, la qualité et l'intégrité des produits. Il vise à promouvoir la qualité et la validité des données d'essai et à améliorer l'acceptation des données générées conformément à ses principes (OCDE 1998).

Code-barres /marqueur du code-barres : région génétique courte et normalisée utilisée pour identifier un organisme au niveau d'une classification taxonomique (p. ex. espèce).

Colorant/agent intercalant (aussi appelé colorant se fixant à l'ADN) : molécules qui s'insèrent entre l'ADN double brin. Dans la qPCR, l'agent émet durant chaque cycle de réaction un signal fluorescent proportionnel à la concentration d'ADN présent dans la réaction (y compris, mais sans s'y limiter, la séquence d'ADN ciblé). On compare la puissance de ce signal fluorescent à une courbe d'étalonnage pour estimer la concentration d'ADN. Le vert SYBR et le vert Eva sont des exemples de colorants intercalants de l'ADN.

Contamination (contamination croisée) : introduction accidentelle de matériel indésirable dans un échantillon qui peut rendre incertains les résultats de l'ADNe en ce qui concerne l'absence ou la présence d'une espèce. La contamination peut se produire à n'importe quelle étape dans le test d'ADNe (p. ex. prélèvement, filtration, préservation, extraction ou test qPCR).

Courbe d'amplification : tracé du signal de fluorescence par rapport au nombre de cycles de qPCR. Le tracé est caractérisé par un point pendant l'amplification d'un produit PCR où il est détecté pour la première fois, et par son accumulation pendant une réaction.

Cq (cycle de quantification) : nombre de cycles de la qPCR auquel la fluorescence générée dans une réaction croise la valeur seuil de fluorescence arbitraire. Une valeur plus basse de Cq correspond à une plus grande quantité de l'ADN ciblé dans un échantillon. Également appelé cycle seuil (Ct).

CRISPR/Cas : système de modification du génome dérivé des bactéries, qui permet d'ajouter, d'enlever ou de modifier du matériel génétique à une séquence ciblée du génome.

Cycle de quantification : voir Cq.

Décontamination : processus d'élimination de tout ADN ou contaminant externe potentiel de l'équipement utilisé pour les tests d'ADNe, comprend habituellement le blanchiment du matériel.

Dégradation de l'échantillon : lorsque l'ADN ou l'ARN d'un échantillon se désintègre parce qu'il a été mal conservé et entreposé en raison de facteurs biotiques (p. ex. activité fongique et bactérienne en présence de niveaux excessifs d'humidité et d'air pendant une période prolongée) et de facteurs liés à la procédure (p. ex. congélation et dégel répétés des échantillons d'ADN). La dégradation a une incidence négative sur la qualité de l'échantillon. Par conséquent, il est important de filtrer et de conserver les échantillons d'ADN le plus tôt possible après le prélèvement afin de prévenir leur dégradation.

Détection : résultat d'ADN qui répond aux paramètres des critères de détection, indiquant la présence de l'ADN ciblé.

Détection négative dans un réplicat de qPCR, un échantillon, une station ou un site : niveau de détection qui ne respecte pas la limite des paramètres de détection.

Détection non concluante : détection de l'ADN qui ne répond pas aux paramètres des critères de détection. Ceci peut indiquer que d'autres analyses pourraient être nécessaires.

Détection positive dans un réplicat de qPCR, un échantillon, une station ou un site : niveau de détection qui atteint ou dépasse la limite des paramètres de détection.

Échantillon en vrac : échantillon résultant de l'agrégation planifiée ou de la combinaison d'échantillons unitaires. (p. ex. zooplancton et homogénéisation des microorganismes).

Efficacité de la qPCR : fraction des molécules d'ADN qui est amplifiée (doublement de la concentration d'ADN comme prévu) dans un cycle de la PCR. Il s'agit d'un indicateur du rendement d'un test qPCR. Il représente le rapport du nombre de molécules du gène ciblé à la fin d'un cycle de la qPCR et du nombre de molécules ciblées au début du même cycle de la qPCR. En général, les efficacités acceptables de la qPCR sont de l'ordre de 90 à 110 %.

Effort d'échantillonnage : nombre de sites, de stations et de réplicats sur le terrain. Le niveau d'effort d'échantillonnage requis varie en fonction de l'assemblage d'ADN dans l'écosystème et est déterminé en fonction du niveau minimal d'effort nécessaire pour atteindre le niveau de confiance requis dans l'évaluation.

Élution : extraction d'un matériel (p. ex. ADN) à partir d'un autre, habituellement au moyen d'un solvant (p. ex. eau, tampon).

Espèce inscrite en vertu de la *Loi sur les espèces en péril* : espèce figurant sur la Liste des espèces en péril à l'annexe 1 de la *Loi sur les espèces en péril* (2002). Espèce sauvage disparue du pays, en voie de disparition, menacée ou préoccupante.

Extraction d'ADN : processus qui consiste à isoler et à purifier l'ADN d'un échantillon à l'aide d'une combinaison de méthodes physiques et chimiques.

Faux négatif : ne pas détecter l'ADN d'une espèce dans un échantillon environnemental prélevé dans une zone où cette espèce est effectivement présente. Les causes possibles sont une erreur d'échantillonnage (l'ADN n'a pas été prélevé dans les échantillons), la dégradation de l'ADN à la suite d'une manipulation ou d'un entreposage inadéquats, une extraction inefficace de l'ADN à partir des échantillons environnementaux, ou un test qPCR qui n'est pas suffisamment sensible. Également appelé erreur de type 2.

Faux positif : conclure à la présence d'ADN d'une espèce dans un échantillon environnemental prélevé dans une zone d'où cette espèce est absente. Les causes possibles sont une mauvaise interprétation des résultats de qPCR, une contamination non détectée, ou un test qPCR qui n'est pas spécifique. Également appelé erreur de type 1.

Fluorescence : émission lumineuse en présence de l'ADN ciblé, produite par des agents/colorants intercalants d'ADN ou des sondes marquées par fluorescence.

Fournisseur de services d'ADNe : gestionnaire de projet global qui est chargé de communiquer les résultats au demandeur (l'utilisateur final). Un fournisseur de services peut comprendre des chercheurs ou des praticiens gouvernementaux ou non gouvernementaux, ou des experts-conseils tiers.

gBlock : fragments synthétiques d'ADN double brin utilisés comme étalons dans la qPCR.

Génome : l'ensemble de l'ADN d'un organisme.

Groupe taxonomique/taxon : groupe d'organismes assignés à une catégorie particulière de classification (p. ex. espèce, genre, ordre).

Inhibition/inhibiteur : substances non ciblées dans l'environnement (p. ex. total des solides en suspension) qui demeurent présentes dans l'échantillon au moment du prélèvement et pendant l'extraction d'ADN. Les inhibiteurs sont habituellement co-extraits avec l'ADN ciblé et inhibent la réaction de PCR/qPCR. L'absence de test/caractérisation de la présence d'inhibition dans les échantillons peut résulter en de faux négatifs. L'inhibition de la PCR est déterminée à l'aide d'un contrôle positif interne (CPI).

in silico : effectué ou produit par modélisation ou simulation computationnelle.

in situ : à son emplacement d'origine.

in vitro : effectué ou se déroulant dans une éprouvette, une boîte de Pétri ou ailleurs à l'extérieur d'un organisme vivant.

Limite de détection (LD) : concentration d'analyte (l'ADN ciblé) la plus faible pouvant être détectée avec un niveau de confiance défini (avec un taux de détection de 95 % comme niveau de confiance standard). La LD peut être déterminée à l'aide de méthodes utilisant des seuils discrets ou de méthodes d'ajustement de courbe (Klymus *et al.* 2019).

Limite de quantification (LQ) : concentration d'analyte (l'ADN ciblé) la plus faible dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une précision et une exactitude acceptables, dans des conditions expérimentales énoncées. Pour les tests qPCR, la précision peut être évaluée à l'aide du coefficient de variation (CV) des concentrations mesurées des étalons. La limite de quantification est essentielle dans les études visant à déterminer les relations prédictives entre la concentration d'ADNe et la biomasse ou l'abondance relative de l'espèce ciblée.

Longueur de l'amplicon : longueur d'un amplicon précis, exprimée en nombre total de paires de bases.

Marqueur : séquence d'ADN qui peut servir à identifier des individus ou des espèces lorsque des variants sont observables.

Matrice d'eau : composantes d'un échantillon autres que l'ADNe. La matrice peut avoir un effet considérable sur la façon dont le test qPCR est effectuée et sur la qualité des résultats obtenus.

Mélange concentré (« Master mix ») : solution concentrée mélangée au préalable qui comprend toutes les composantes d'une réaction de PCR ou qPCR, mais ne contient pas d'amorces de test (ni de sondes), ni l'ADN ciblé.

Métabarcoding : voir métabarcoding d'ADN.

Métabarcoding/ métacodage à barres d'ADN : méthode moléculaire permettant le séquençage en masse d'ADN et l'identification moléculaire simultanée de plusieurs taxons à partir d'un échantillon complexe. Nécessite habituellement un ou plusieurs ensembles d'amorces universelles de PCR pour amplifier les codes-barres d'ADN provenant des collectes massives d'organismes ou d'ADNe.

Métadonnées : ensemble de données qui décrit d'autres données et offre de l'information sur celles-ci.

Méthodes ciblées : méthode de plan d'étude qui utilise des amorces propres à une espèce pour tenter de détecter une seule espèce à partir d'un échantillon, généralement par qPCR.

Méthodes de monitoring classiques : suivi des espèces qui repose sur leur identification physique par des relevés visuels, le dénombrement des individus sur le terrain ou l'utilisation de caractères morphologiques distincts. Il faut parfois faire appel à une expertise taxonomique pour identifier les organismes difficiles à classifier à l'aide de méthodes non génétiques.

Multiplex/multiplexage : Combinaison de plusieurs tests utilisant de multiples marqueurs génétiques dans une seule réaction de qPCR pour détecter un ou plusieurs organismes. Le multiplexage raccourcit les temps de traitement et réduit l'utilisation des réactifs, mais peut être plus difficile à optimiser que les réactions de test unique.

Nombre de copies : nombre de copies d'un fragment d'ADN.

Non détecté : résultat de test indiquant qu'il a été déterminé que l'ADNe d'une espèce ciblée n'était pas présent dans un échantillon d'ADNe.

Paire de bases (pb) : paire de bases complémentaires dans une molécule d'acide nucléique double brin, composée d'une base purique dans un brin liée par des liaisons hydrogène à une base pyrimidique dans l'autre. Peut servir d'unité de mesure pour décrire la longueur de l'ADN.

Paramètres du thermocycleur/paramètres du cycle : chaque cycle de la réaction de PCR comporte une étape pour la dénaturation de la matrice, l'anneau des amorces et l'extension des amorces. Les paramètres du thermocycleur/paramètres du cycle correspondent à la température et au temps requis pour chacune de ces étapes. Les paramètres du cycle comprennent également le nombre de répétitions de la réaction PCR nécessaires pour obtenir l'amplification maximale (généralement de 35 à 40 cycles).

PCR par gouttelettes digitales (ddPCR) : méthode d'exécution de PCR qui repose sur la technologie des gouttelettes d'émulsion eau-huile afin de répartir une seule réaction de PCR en milliers de réactions d'amplification indépendantes. Les méthodes permettent la quantification absolue de l'ADN ciblé.

Pipeline bioinformatique : analyses bioinformatiques qui consistent à soumettre de gros fichiers à une série de transformations, appelées pipeline.

Probabilité de détection : méthode statistique qui fait appel à un échantillonnage répété du même site pour estimer l'occupation réelle d'un site donné par une espèce ou une cible particulière. Les probabilités de détection ne peuvent être déterminées qu'après une étude.

Procédure opérationnelle normalisée (PON) : ensemble d'instructions écrites qui décrivent en détail la façon d'effectuer un processus ou une expérience en laboratoire de manière sécuritaire, efficace et uniforme.

Quantification absolue (méthode de la courbe d'étalonnage du test qPCR) : méthode de quantification pour déterminer la concentration exacte d'un produit d'ADN ciblé en établissant un lien entre la valeur du cycle de quantification (Cq) et une courbe d'étalonnage pour extrapoler une valeur.

Quantification relative : analyse les changements dans un échantillon donné par rapport à un autre échantillon (p. ex. un échantillon témoin non traité).

Réaction en chaîne de la polymérase (PCR) : technique moléculaire qui reproduit et amplifie des séquences d'ADN ciblé afin de produire suffisamment de copies convenant aux analyses

génétiques. Il s'agit d'un processus de chauffage et de refroidissement (cycles), où les amorces se lient à une séquence d'ADN correspondante pendant chaque cycle et une polymérase réplique la séquence d'ADN entre ces amorces. À la fin de la réaction de PCR, la séquence ciblée est présente dans la réaction en millions de copies (amplicons). Afin de visualiser ces courts fragments d'ADN, le produit de la PCR doit être traité sur électrophorèse en gel. La PCR est souvent appelée PCR conventionnelle (cPCR).

Réaction en chaîne de la polymérase quantitative (qPCR) : quantification en temps réel des fragments d'ADN amplifiés pendant la réaction de PCR. La qPCR utilise les mêmes principes de la PCR comportant des amorces et une polymérase de l'ADN, mais utilise un colorant se fixant à l'ADN qui s'intercale avec l'ADN ou une sonde qui s'hybride avec la séquence ciblée, ce qui permet de visualiser en temps réel l'amplification de la séquence ciblée (amplicon). Selon l'approche, cette méthode peut produire une quantification absolue dans un échantillon ou une quantification relative entre les échantillons.

Répétabilité : niveau de concordance entre les résultats des réplicats dans et entre les exécutions d'un même test dans un laboratoire donné.

Réplicat : collecte ou analyse répétée d'un échantillon pour réduire l'erreur dans les résultats causée par des niveaux élevés de variation entre les mesures répétées.

- **Réplicats sur le terrain :** unités d'échantillonnage séparées prélevées le plus près possible du même point dans l'espace et le temps, entreposées dans des contenants distincts et analysées séparément.
- **Réplicat de filtre :** les réplicats de filtre sont obtenus en coupant les filtres en morceaux et en analysant les morceaux séparément.
- **Réplicat de laboratoire ou technique :** réplicat de la PCR, où le même ADN est analysé dans des réactions distinctes.

Reproductibilité : capacité d'une méthode d'essai de produire des résultats uniformes lorsqu'elle est appliquée à des aliquotes des mêmes échantillons soumises au même test dans différents laboratoires (y compris les réactifs et les témoins).

Sensibilité : capacité d'un test qPCR de détecter la cible prévue. La capacité de détecter un vrai positif.

Séquençage à haut débit (HTS) : voir séquençage de nouvelle génération.

Séquençage de nouvelle génération (NGS) : aussi connu sous le nom de séquençage à haut débit. Terme fourre-tout utilisé pour décrire un certain nombre de technologies de séquençage modernes (autres que celles de Sanger), y compris le séquençage Illumina [Solexa].

Séquençage Sanger : méthode traditionnelle de séquençage de l'ADN reposant sur l'incorporation sélective de didéoxynucléotides de terminaison de chaîne par l'ADN polymérase pendant la réplification in vitro de l'ADN.

Séquence ciblée : séquence d'ADN clé, gène ou région d'intérêt qui, une fois amplifiée, permet d'identifier le groupe taxonomique ciblé.

Seuil de détection : point auquel une réaction de qPCR atteint une intensité fluorescente supérieure au niveau de bruit de fond (voir cycle de quantification).

Site : zone particulière, dans un emplacement d'échantillonnage, où l'eau (ou un autre substrat environnemental) sera prélevée.

Sonde : oligonucléotide (courte séquence d'ADN ou d'ARN) marqué par fluorescence ajouté à la réaction de qPCR qui reconnaît une séquence spécifique sur le produit désiré de la PCR. Les sondes qPCR constituent une solution de rechange aux colorants se fixant à l'ADN (agents intercalants), car elles augmentent généralement la spécificité et la sensibilité puisque seules des molécules d'ADN propres à la cible seront marquées. Dans une qPCR reposant sur une sonde, la sonde émet un signal fluorescent durant chaque cycle de réaction, proportionnel à la concentration de la séquence d'ADN ciblée. On compare la puissance de ce signal fluorescent à une courbe d'étalonnage pour estimer la concentration de l'ADN ciblé.

Spécificité : capacité d'un test qPCR de distinguer ou de différencier des espèces qui sont génétiquement similaires. La capacité d'un test de détecter un vrai négatif.

Station : emplacements d'échantillonnage spatialement distincts dans un site.

Suivi/monitorage biologique des espèces : processus consistant à effectuer des observations fiables à partir de la nature pour détecter, mesurer, évaluer et tirer des conclusions sur la façon dont les espèces évoluent dans le temps et l'espace.

Taux d'ADNe secrété : vitesse à laquelle un organisme rejette son matériel génétique (ADN) dans un environnement. Les taux d'excrétion peuvent être influencés par la saisonnalité, les taux de croissance, la reproduction et les taux métaboliques.

Témoins (contrôles):

- **Témoin positif** : témoin dans un traitement dont on sait qu'il produit des résultats. Les témoins positifs servent à évaluer la validité et la fiabilité des résultats d'ADNe en garantissant que les procédures dans l'analyse de l'ADNe se déroulent comme prévu ou sont utilisés comme étalons pour relever les écarts par rapport aux résultats attendus.
- **Témoin positif de qPCR** : échantillon contenant habituellement l'ADN ciblé dont on sait qu'il s'amplifie dans une réaction qPCR. Un témoin positif de qPCR détermine si les conditions de la réaction de PCR sont optimales ou non. Il devrait produire une valeur dans un intervalle prédéterminé.
- **Contrôle positif interne (CPI)** : composé d'une matrice d'ADN unique (c.-à-d. non trouvée dans un échantillon d'essai) et d'une paire d'amorces spécifiques ajoutée à l'isolat ou à l'échantillon purifié. Un CPI peut être intégré à n'importe quelle étape du test d'ADNe (pendant l'extraction, la purification ou l'amplification) et est amplifié à l'aide de ses propres amorces/sondes uniques. Un CPI permet de détecter les problèmes techniques survenus pendant l'extraction, la purification ou l'amplification de l'ADN et de détecter l'inhibition dans la PCR. Également appelé contrôle interne d'amplification (CIA) lorsqu'il est utilisé pendant la qPCR, il s'agit d'une composante clé utilisée pour détecter l'inhibition de la PCR.
- **Témoin négatif** : échantillon qui contient toutes les composantes essentielles d'un traitement expérimental, à l'exception de l'analyte testé. Voir aussi blanc d'échantillon.

Test : procédure visant à évaluer qualitativement ou à mesurer quantitativement la présence, la quantité ou l'activité fonctionnelle d'une entité ciblée (p. ex. test qPCR).

Utilisateur final d'ADNe : gestionnaire, client ou demandeur de services d'ADNe qui utilise les résultats d'ADNe dans divers contextes, comme la conservation et la gestion, ou à qui ces résultats sont destinés.

Validation/méthodes validées : processus utilisé pour confirmer qu'une procédure d'analyse utilisée pour un essai particulier convient à l'utilisation prévue. Les méthodes validées assurent la qualité, la fiabilité et l'uniformité des résultats de l'analyse.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Baillie, S.M., McGowan, C., May-McNally, S., Leggatt, R., Sutherland, B., and Robinson, S. 2019. Environmental DNA and its applications to Fisheries and Oceans Canada: National needs and priorities. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 3329: xiv + 84p.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., and Wittwer, C.T. 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. 55(4): 611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
- Bustin, S. and Nolan, T. 2017. Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research. Eur. J. Clin. Invest. 47(10): 756-774.
- Bylemans, J., Gleeson, D.M., Duncan, R.P., Hardy, C.M., and Furlan, E.M. 2019. A performance evaluation of targeted eDNA and eDNA metabarcoding analyses for freshwater fishes. Environmental DNA 1: 402-414. doi:10.1002/edn3.41.
- CSA 2019. [Environmental DNA standardization needs for fish and wildlife population assessments and monitoring](#). Canadian Standards Association Report. 41p.
- Capo, E., Spong, G., Norman, S., Königsson, H., Bartels, P., and Byström, P. 2019. Droplet digital PCR assays for the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from environmental DNA collected in the water of mountain lakes. PLoS One 14(12): e0226638. doi:10.1371/journal.pone.0226638.
- Cristescu, M.E. 2019. Can environmental RNA revolutionize biodiversity science? Trends Ecol. Evol. 34(8): 694-697.
- De Souza, L.S., Godwin, J.C., Renshaw, M.A. and Larson, E. 2016. Environmental DNA (eDNA) detection probability is influenced by seasonal activity of organisms. PLoS One 11(10): p.e0165273.
- Erickson, R.A., Merkes, C.M., and Mize, E.L. 2019. Sampling designs for landscape-level eDNA monitoring. Integr. Environ. Assess. Manage. 15(5): 760-771. doi.org/10.1002/ieam.4155
- Ficetola, G.F., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Giguët-Covex, C., De Barba, M., Gielly, L., Lopes, C.M., Boyer, F., Pompanon, F., Rayé, G. and Taberlet, P. 2015. Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. Mol. Ecol. Resour. 15: 543–556. doi:10.1111/1755-0998.12338.
- Ficetola, G.F., Taberlet, P., and Coissac, E. 2016. How to limit false positives in environmental DNA and metabarcoding? Mol. Ecol. Resour. 16: 604-607. doi:10.1111/1755-0998.12508.
- Gingera, T.D., Bajno, R., Docker, M.F., and Reist, J.D. 2017. Environmental DNA as a detection tool for zebra mussels *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) at the forefront of an invasion event in Lake Winnipeg, Manitoba, Canada. Manag. Biol. Invasions 8(3): 287-300. doi.org/10.3391/mbi.2017.8.3.03.
- Goldberg, C.S., Turner, C.R., Deiner, K., Klymus, K.E., Thomsen, P.F., Murphy, M.A., Spear, S.F., McKee, A., Oyler-McCance, S.J., Cornman, R.S., Laramie, M.B., Mahon, A.R., Lance, R.F., Pilliod, D.S., Strickler, K.M., Waits, L.P., Fremier, A.K., Takahara, T., Herder, J.E., and Taberlet, P. 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. Methods Ecol. Evol. 7: 1299-1307. doi:10.1111/2041-210X.12595.
- Harrison, J.B., Sunday, J.M., and Rogers, S.M. 2019. Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. Proc. Biol. Sci. 286(1915): 20191409. doi.org/10.1098/rspb.2019.1409.

-
- Hinlo, R., Gleeson, D., Lintermans, M., and Furlan, E. 2017. Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLoS One* 12(6): e0179251. doi.org/10.1371/journal.pone.0179251.
- Jerde, C.L., Mahon, A.R., Chadderton, W.L., and Lodge, D.M. 2011. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv. Lett.* 4(2): 150-157. doi:10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x.
- Jo, T., Murakami, H., Yamamoto, S., Masuda, R., and Minamoto, T. 2019. Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecol. Evol.* 9(3): 1135-1146. doi:10.1002/ece3.4802.
- Klymus, K.E., Richter, C.A., Chapman, D.C., and Paukert, C. 2015. Quantification of eDNA shedding rates from invasive Bighead Carp *Hypophthalmichthys nobilis* and Silver Carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biol. Conserv.* 183: 77-84. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.020.
- Klymus, K.E., Merkes, C.M., Allison, M.J., Goldberg, C.S., Helbing, C.C., Hunter, M.E., Jackson, C.A., Lance, R.F., Mangan, A.M., Monroe, E.M., Piaggio, A.J., Stokdyk, J.P., Wilson, C.C., and Richter, C.A. 2019. Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA* 00: 1-12. doi:10.1002/edn3.29.
- Lacoursière-Roussel, A., Rosabal, M., and Bernatchez, L. 2016a. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions. *Mol. Ecol. Resour.* 16(6): 1401– 1414. doi:10.1111/1755-0998.12522.
- Lacoursière-Roussel, A., Dubois, Y., Normandeau, E. and Bernatchez, L. 2016b. Improving herpetological surveys in eastern North America using the environmental DNA method. *Genome* 59(11): 991-1007.
- Lahoz-Monfort, J.J., Guillera-Arroita, G., and Tingley, R. 2016. Statistical approaches to account for false-positive errors in environmental DNA samples. *Mol. Ecol. Resour.* 16(3): 673-685. doi:10.1111/1755-0998.12486.
- Leese, F., Altermatt, F., Bouchez, A., Ekrem, T., Hering, D., Meissner, K., ... Zimmermann, J. 2016. DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *Res. Ideas Outcomes* 2: e11321. doi:10.3897/rio.2.e11321
- Mulero, S., Boissier, J., Allienne, J-F., Quilichini, Y., Foata, J., Pointier, J-P., and Rey, O. 2019. Environmental DNA for detecting *Bulinus truncatus*: A new environmental surveillance tool for schistosomiasis emergence risk assessment. *Environmental DNA* 00: 1-14. doi.org/10.1002/edn3.53.
- Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M., and Minamoto, T. 2014. The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. *PLoS One* 9(12): e114639. doi:10.1371/journal.pone.0114639.
- Mauvisseau, Q., Davy-Bowker, J., Bulling, M., Brys, R., Neyrinck, S., Troth, C., and Sweet, M. 2019. Combining ddPCR and environmental DNA to improve detection capabilities of a critically endangered freshwater invertebrate. *Sci. Rep.* 9(1): 1-9. doi:10.1038/s41598-019-50571-9.
- McNair, J.N., and Newbold, J.D. 2012. Turbulent particle transport in streams: can exponential settling be reconciled with fluid mechanics? *J. Theor. Biol.* 300: 62– 80. doi:10.1016/j.jtbi.2012.01.016.
- Nicholson, A., Mclsaac, D., MacDonald, C., Gec, P., Mason, B.E., Rein, W., Wrobel, J., de Boer, M., Milián-García, Y., and Hanner, R.H. 2020. An analysis of metadata reporting in freshwater environmental DNA research calls for the development of best practice guidelines. *Environmental DNA* 00: 1-7. doi:10.1002/edn3.81.
-

-
- Nguyen, P.L., Sudheesh, P.S., Thomas, A.C., Sinnesael, M., Haman, K., and Cain, K.D. 2018. Rapid detection and monitoring of *Flavobacterium psychrophilum* in water by using a handheld, field-portable quantitative PCR system. *J. Aquat. Anim. Health* 30(4): 302-311. doi:10.1002/aah.10046.
- OECD 1998. [OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring](#). Organisation for Economic Co-operation and Development. Paris. 41p.
- OIE 2019. [Manual of diagnostic tests for aquatic animals](#). World Organisation for Animal Health. Chapter 1.1.2. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases.
- Pourmoghadam, M.N., Poorbagher, H., de Oliveira Fernandes, J.M., and Jafari, O. 2019. Diazinon negatively affects the integrity of environmental DNA stability: a case study with common carp (*Cyprinus carpio*). *Environ. Monit. Assess.* 191(11): 672. doi:10.1007/s10661-019-7816-2.
- Ruppert, K.M., Kline, R.J., and Rahman, M.S. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Glob. Ecol. Conserv.* 17: e00547. doi:10.1016/j.gecco.2019.e00547.
- Sansom, B.J., and Sassoubre, L.M. 2017. Environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates to model freshwater mussel eDNA transport in a river. *Environ. Sci. Technol.* 51(24): 14244-14253. doi:10.1021/acs.est.7b05199.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., and Johne, R. 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113(5): 1014-1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- Schloesser, N.A., Merkes, C.M., Rees, C.B., Amberg, J.J., Steeves, T.B. and Docker, M.F. 2018. Correlating sea lamprey density with environmental DNA detections in the lab. *Manag. Biol. Invasions* 9(4): 483-495.
- Sepulveda, A.J., Birch, J.M., Barnhart, E.P., Merkes, C.M., Yamahara, K.M., Marin III, R., Kinsey, S.M., Wright, P.R., and Schmidt, C. 2020a. Robotic environmental DNA bio-surveillance of freshwater health. *Sci. Rep.* 10:14389. doi.org/10.1038/s41598-020-71304-3
- Sepulveda, A.J., Hutchins, P.R., Jackson, C., Ostberg, C., Laramie, M.B., Amberg, J., Tim Counihan, T., Hoegh A., and Pilliod, D.S. 2020b. A round-robin evaluation of the repeatability and reproducibility of environmental DNA assays for dreissenid mussels. *Environmental DNA*. doi.org/10.1002/edn3.68.
- Sepulveda, A.J., Nelson, N.M., Jerde, C.L., and Luikart, G. 2020c. Are environmental DNA methods ready for aquatic invasive species management? *Trends Ecol. Evol.* 35(8): 668-678. doi.org/10.1016/j.tree.2020.03.011.
- Sevellec, M., Lacoursière-Roussel, A., Bernatchez, L., Normandeau, E., Solomon, E., Arreak, A., Fishback, L., and Howland, K. 2020. Detecting community change in Arctic marine ecosystems using the temporal dynamics of environmental DNA. *Environmental DNA*. doi.org/10.1002/edn3.155.
- Shogren, A.J., Tank, J.L., Andruszkiewicz, E., Olds, B., Mahon, A.R., Jerde, C.L., and Bolster, D. 2017. Controls on eDNA movement in streams: transport, retention, and resuspension. *Sci. Rep.* 7(1): 5065. doi:10.1038/s41598-017-05223-1.

-
- Shogren, A.J., Tank, J.L., Egan, S.P., August, O., Rosi, E.J., Hanrahan, B.R., Renshaw, M.A., Gantz, C.A., and Bolster, D. 2018. Water flow and biofilm cover influence environmental DNA detection in recirculating streams. *Environ. Sci. Technol.* 52(15): 8530-8537. doi:10.1021/acs.est.8b01822.
- Shu, L., Ludwig, A., and Peng, Z. 2020. Standards for methods utilizing environmental DNA for detection of fish species. *Genes* 11(3): 296. doi:10.3390/genes11030296.
- Sigsgaard, E.E., Carl, H., Møller, P.R., and Thomsen, P.F. 2015. Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biol. Conserv.* 183: 46-52. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.023.
- Spear, M.J., Embke, H.S., Krysan, P.J., and Vander Zanden, M.J. 2020. Application of eDNA as a tool for assessing fish population abundance. *Environmental DNA* 00: 1-9. doi:10.1002/edn3.94.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., and Kawabata, Z. 2012. Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PLoS One* 7(4): e35868. doi:10.1371/journal.pone.0035868.
- Thalinger, B., Deiner, K., Harper, L.R., Rees, H.C., Blackman, R.C., Sint, D., Traugott, M., Goldberg, C.S., and Bruce, K. 2021. A validation scale to determine the readiness of environmental DNA assays for routine species monitoring. *Environmental DNA* 00: 1-14. doi.org/10.1002/edn3.189.
- Thomas, A.C., Tank, S., Nguyen, P.L., Ponce, J., Sinnesael, M., and Goldberg, C.S. 2019. A system for rapid eDNA detection of aquatic invasive species. *Environmental DNA* 00: 1-10. doi:10.1002/edn3.25.
- Thomsen, P.F. and Willerslev, E. 2015. Environmental DNA-An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.* 183: 4-18. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.019.
- Tillotson, M.D., Kelly, R.P., Duda, J.J., Hoy, M., Kralj, J., and Quinn, T.P. 2018. Concentrations of Environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biol. Conserv.* 220: 1-11. doi:10.1016/j.biocon.2018.01.030.
- Wilcox, T.M., McKelvey, K.S., Young, M.K., Sepulveda, A.J., Shepard, B.B., Jane, S.F., Whiteley, A.R., Lowe, W.H., and Schwartz, M.K. 2016. Understanding environmental DNA detection probabilities: a case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biol. Conserv.* 194: 209-216. doi:10.1016/j.biocon.2015.12.023.
- Williams, M.A., O'Grady, J., Ball, B., Carlsson, J., de Eyto, E., McGinnity, P., Jennings, E., Regan, F., and Parle-McDermott, A. 2019. The application of CRISPR-Cas for single species identification from environmental DNA. *Mol. Ecol. Resour.* 19(5): 1106-1114. doi:10.1111/1755-0998.13045.
- Yamahara, K.M., Preston, C.M., Birch, J.M., Walz, K.R., Marin III, R., Jensen, S., Pargett, D., Roman, B., Zhang, Y., Ryan, J., and Ussler, B. 2019. In-situ autonomous acquisition and preservation of marine environmental DNA using an autonomous underwater vehicle. *Front. Mar. Sci.* 6: 373.

ANNEXE 1. MODÈLE DE RAPPORT SUR L'ADNe*

I. Analyse de l'ADNe – Renseignements relatifs à la soumission des échantillons				
Titre du rapport :				
Numéro du projet :		Date du rapport final :		
Renseignements sur le fournisseur de services	Type :		Renseignements sur l'organisation ayant présenté la demande	
	Nom de la personne-ressource :			Nom de l'organisation :
	Adresse :			Nom de la personne-ressource :
	Téléphone de la personne-ressource :			Téléphone de la personne-ressource :
	Adresse courriel de la personne-ressource :			Adresse courriel de la personne-ressource :
ACCRÉDITATION/CERTIFICATION DU LABORATOIRE :				
Sommaire – Objectifs de l'étude, justification et principales conclusions tirées des échantillons d'ADNe et des témoins				
Annexes (Obligatoires)		Cochez pour confirmer l'inclusion	Annexes (supplémentaires)	
<i>Annexe 1 : Cartes des sites et des lieux d'échantillonnage de l'étude</i>		<input type="checkbox"/>	<i>Annexe 5 :</i>	
<i>Annexe 2 : Procédures de prévention de la contamination</i>		<input type="checkbox"/>	<i>Annexe 6 :</i>	
<i>Annexe 3 : Protocole de qPCR</i>		<input type="checkbox"/>	<i>Annexe 7 :</i>	
<i>Annexe 4 : Métadonnées et données sur la qPCR</i>		<input type="checkbox"/>	<i>Annexe 8 :</i>	
II. Plan d'étude et échantillonnage de l'ADNe				
A. Information sur l'étude	A.1 Espèce ciblée (nom commun et nom latin)			
	A.2 Objectifs de l'étude :			
	A.3 Emplacement ou région géographique :			
	A.4 Date d'échantillonnage (période) :		Début :	Fin :
	A.5 Types d'échantillons :			
	A.6 Bases de données cartographiques (toutes) :			
B. Plan d'étude	B.1 Types d'écosystèmes :			
	B.2 Plan d'échantillonnage (comment l'échantillonnage optimise-t-il la détection de l'espèce pour l'objectif de l'étude?) :			
	B.3 Nombre de sites échantillonnés :			
	B.4 Nombre de stations échantillonnées dans les sites (ajouter une explication si le nombre varie entre les sites) :			
	B.5 Nombre de réplicats d'échantillons sur le terrain :			
	B.6 Série chronologique (nombre de fois où les sites et les stations ont été échantillonnés) :			
	B.7 Conditions environnementales, observations pertinentes et données de terrain supplémentaires :			
	B.8 Blancs et témoins de terrain (décrire et indiquer le nombre) :			
C. Prélèvement des échantillons d'ADNe	C.1 Méthode de collecte des échantillons environnementaux :			
	C.2 Volume/masse de l'échantillon :			
	C.3 Profondeur(s) de l'échantillonnage :			
	C.4 Entreposage des échantillons sur le terrain/déjà avant le traitement :			
	C.5 Méthode de traitement des échantillons (liste du matériel jetable; agent de conservation utilisé) :			
	C.6 Type de filtre et taille des pores :			
	C.7 Conservation des échantillons :			

*Une version téléchargeable de ce formulaire peut être trouvée [ici](#).

III. Analyse des échantillons d'ADNe – Méthodes de laboratoire

D. Extraction de l'ADN	D.1 Nom de la trousse commerciale ou du protocole :	
	D.2 Protocole de référence :	
	D.3 Témoins d'extraction de l'ADN :	
	D.4 Proportion de l'échantillon total :	
	D.5 Volume d'éluat d'ADN :	
	D.6 Conditions d'entreposage de l'ADNe extrait :	
E. Test qPCR	E.1 Nom du test :	
	E.2 Type de test :	
	E.3 Niveau de validation du test :	
	E.4 Données sur la spécificité :	
	E.5 Dilution et volume d'ADN utilisé :	
	E.6 Témoins positifs et négatifs de la qPCR :	
	E.7 Réplicats techniques par échantillon :	
	E.8 Test d'inhibition :	
	E.9 Nombre de cycles de qPCR :	

IV. Sommaire des résultats de l'ADNe

F. Présentation des résultats des témoins	F.1 Critères pour déterminer si les témoins ont réussi ou échoué :	
	F.2 Résultats des témoins positifs (rapport distinct pour chaque type) :	
	F.3 Résultats des témoins négatifs (rapport distinct pour chaque type) :	
	F.4 Témoins qui ont échoué (rapport et explication) :	
G. Présentation des résultats des échantillons d'ADNe	G.1 LD calculée :	
	G.2 Résultats de la qPCR ayant fait l'objet d'AQ/CQ :	
	G.3 Autres résultats de la qPCR :	
	G.4 Détermination des résultats au niveau de l'échantillon :	
	G.5 Détermination des résultats au niveau de la station :	
	G.6 Détermination des résultats au niveau du site :	
H. Observations finales	H.1 Avertissement (renseignements supplémentaires pour aider à expliquer les résultats des échantillons, des stations ou des sites) :	
	H.2 Sommaire des détections d'ADNe :	
	H.3 Recommandations futures :	

ANNEXE 2. ANNEXES SUR LES MÉTADONNÉES

ANNEXE 1. CARTES DES SITES ET DES LIEUX D'ÉCHANTILLONNAGE DE L'ÉTUDE

Incluez des cartes qui présentent le plan d'échantillonnage spatial et temporel utilisé dans l'étude d'ADNe. Les cartes devraient montrer les emplacements d'échantillonnage (emplacements, sites et stations; voir la section II), la barre d'échelle et les détails sur le mouvement de l'eau entre les stations (p. ex. sens de l'écoulement).

ANNEXE 2. PROCÉDURES DE PRÉVENTION DE LA CONTAMINATION

Donnez des renseignements sur les mesures utilisées pour prévenir la contamination des échantillons d'ADNe et la contamination croisée. Incluez les méthodes de décontamination et les pratiques procédurales durant les processus préalables, sur le terrain et en laboratoire. Signalez tout écart par rapport à la procédure survenu pendant l'étude.

ANNEXE 3. PROTOCOLE DE qPCR

L'information essentielle concernant le test qPCR utilisé doit être fournie directement dans le modèle de rapport (section E). Les renseignements supplémentaires répertoriés dans le tableau 2 ci-dessous doivent être fournis dans un protocole annexé en tant qu'annexe 3; la même annexe 3 peut être utilisée pour toutes les études et dans le temps si ces renseignements restent inchangés. Bien que les séquences de l'amorce et de la sonde soient des informations essentielles pour assurer la reproductibilité de l'étude, elles sont considérées comme facultatives étant donné que certains fournisseurs tiers de services d'ADNe ne divulgueront pas de renseignements commerciaux exclusifs ou confidentiels aux clients.

Tableau 2. Liste des propriétés du test qPCR d'ADNe. Les renseignements essentiels (E) ou facultatifs (F) à inclure dans le protocole de qPCR (annexe 3) sont indiqués (d'après Bustin et al. 2009). L'information fournie dans ce tableau peut être plus constante entre les projets d'ADNe du même fournisseur de services d'ADNe.

1. Renseignements sur la cible de la qPCR	
a) Séquence d'ADN pour l'espèce ciblée. Indiquer le nom du gène et, si disponible, le numéro d'accession dans Genbank.	E
b) Si le test est publié, fournir la référence de la publication.	E
c) Longueur de l'amplicon exprimée en paires de bases (pb).	E
d) Sonde fluorescente, quencher et toutes les modifications de la sonde (p. ex. BTP, BHQ) ou type de colorant/agent intercalant d'ADN.	E
e) Séquences de l'amorce et de la sonde.	F
2. Protocole de qPCR	
a) Mélange concentré (« mastermix ») de qPCR. Indiquez si un mélange commercial ou un mélange maison a été utilisé pour l'amplification. Pour les produits commerciaux, précisez la marque et le type de mélange.	E
b) Paramètres du thermocycleur. Indiquez les paramètres de la qPCR, y compris la dénaturation, l'appariement, l'élongation et le nombre de cycles.	E
c) Instrument de qPCR. Indiquez la marque et le modèle de l'instrument.	E
d) Détermination de la méthode de Cq. Donnez des détails sur la détermination du Cq, comme le logiciel, la détermination du seuil, etc.	E

ANNEXE 4. MÉTADONNÉES ET DONNÉES SUR LA qPCR

Ces tableaux obligatoires permettent un suivi et une traçabilité complets des échantillons grâce au traitement et à l'analyse. Les renseignements sur l'échantillonnage, le traitement (p. ex. filtration) et les résultats du test qPCR doivent être correctement catalogués pour tous les échantillons. Le format des métadonnées et du modèle de données sur la qPCR donne un exemple de la façon dont les données essentielles et facultatives associées aux résultats de l'ADNe peuvent être présentées. Le tableau 3 dresse une liste des métadonnées obligatoires et facultatives, mais ne se veut pas exhaustif. Le format suggéré pour cette annexe est un fichier Microsoft Excel.

Tableau 3. Liste des renseignements à fournir dans les tableaux de métadonnées obligatoires et de données sur la qPCR. Renseignements essentiels (E) et facultatifs (F) à inclure dans l'annexe 4. Ce tableau contient des renseignements qui varieront ou peuvent varier entre les projets d'ADNe.

1. Métadonnées	
a) Région géographique	E
b) Site	E
c) Station	E
d) Échantillon prélevé sur le terrain	E
e) Coordonnées spatiales (degrés décimaux)	E
f) Date de prélèvement (mm/jj/aaaa)	E
g) Heure du prélèvement (hh:mm; système horaire de 24 heures ou heure militaire), y compris le fuseau horaire	E
h) Nom de la personne ayant effectué le prélèvement	E
i) Conditions environnementales (voir B.7 pour plus de détails)	F
j) Traitement de l'ADNe (p. ex. date et heure de filtration, aliquotage des sédiments, écarts propres à l'échantillon par rapport à un plan d'échantillonnage, justification des modifications et autres renseignements qui dépendent de l'étude; voir la section C pour plus de détails)	E
2. Données sur la qPCR	
a) Cq pour chaque réplicat de qPCR	E
b) Efficacité du test pour chaque exécution (courbes d'étalonnage : R ² , équation de pente et ordonnée à l'origine)	E
c) Résultat pour chaque échantillon (p. ex. détecté, non détecté ou non concluant; voir la section G)	F