



HAL
open science

Techniques de collecte, conditionnement et conservation des échantillons en vue de l'analyse

Christian Mougin, Stephen Mulero, Cindy Arnoldi, Olivier Ravel, Alyssa
Clavreul

► To cite this version:

Christian Mougin, Stephen Mulero, Cindy Arnoldi, Olivier Ravel, Alyssa Clavreul. Techniques de collecte, conditionnement et conservation des échantillons en vue de l'analyse. École thématique. Webinaire Respire - AnaEE-France, France. 2024. hal-04853548

HAL Id: hal-04853548

<https://hal.inrae.fr/hal-04853548v1>

Submitted on 22 Dec 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

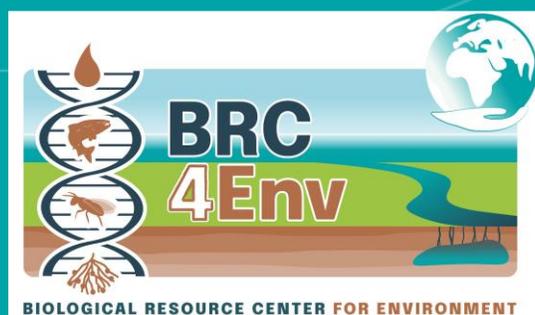
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



RESPIRE



Techniques de collecte, conditionnement et conservation des échantillons en vue de l'analyse

Christian Mougin, Stephen Mulero, Cindy Arnoldi, Olivier Ravel, Alyssa Clavreul

17 décembre 2024

Introduction

- Les échantillons environnementaux (sols), formés d'éléments biotiques et abiotiques, sont complexes et hétérogènes
- Le prélèvement des échantillons est l'étape initiale clé qui va influencer sur la qualité et la pertinence des résultats analytiques
- Le prélèvement (la collecte) est indissociable de l'analyse (caractérisation), en passant par la conservation, voire la distribution entre plusieurs partenaires
- Il faut tenir compte des questions scientifiques posées, des mesures qui seront effectuées *in fine*, d'éventuelles réutilisations, et des répercussions qui peuvent en découler sur les paramètres mesurés
- De nombreux points sont à considérer !

Quelques points d'attention

- Définir les objectifs scientifiques
- Préparer et appliquer un plan d'échantillonnage :
 - Elaborer des stratégies d'investigation de site en recueillant des informations sur les propriétés du sol, leur variabilité et leur répartition spatiale
 - Décrire les échantillons à prélever, la façon de les prélever en intégrant les contraintes éventuelles et l'endroit où les prélever (géolocalisation)
- Prendre en compte les exigences de l'analyse (par exemple essais biologiques, essais physiques, échantillons remaniés ou non remaniés), échantillonnages composites, spécifiques...
- Choisir et appliquer les techniques de prélèvement : prélever des échantillons représentatifs
 - Choisir le matériel et les techniques à employer (différentes profondeurs...)
- Prélèvements élémentaires > Echantillon global (composite) > trié > réduit (quartage) pour laboratoire

Quelques grandes étapes

- Choix des sites : noter sur une carte, repères spécifiques, SIG, marquage des points
- Description du lieu de prélèvement : historique du site, topographie, couverture, zonage > visite
- Conditions d'échantillonnage : humidité, température, profondeur, date/saison si suivi pluri annuel ou traitement (fertilisation...), autres intervenants (programme pluri partenaires)
- Méthode d'échantillonnage : aérobie/anaérobie, débris végétaux
- Etiquetage : numéro unique, marquage permanent, lien avec le lieu de prélèvement
- Conditions de transport : maintien des propriétés, délai, abri de la lumière, température (congélation...), réglementation (propriété, quarantaine, APA...)
- Condition et durée de conservation : dépendent des analyses à réaliser

Les outils

- Les normes, guides et lignes directrices (par exemple ISO > AFNOR...)
- Le PGD : le PGD doit être un outil pour construire le PGE
- Solution de géolocalisation : SIG
- Solution informatique de gestion des échantillons : Collec-Science <https://www.collec-science.org/>

- Echantillon + données = ressources (biologique)



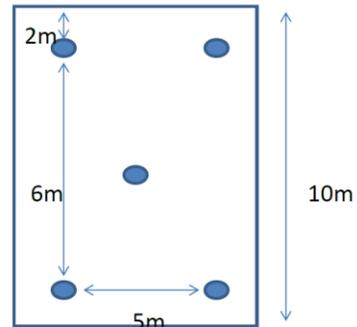
Plateforme CA-SYS Dijon



INRAE

Exemple : les activités enzymatiques des sols

- Conditions de prélèvement
- Matériel
- Prélèvement



Exemple de prélèvements

	Mode Opérateur	MO-BCE-ECH-SOL
	Stratégie d'échantillonnage pour les mesures biologiques des sols	Version : 3.0 Création : 13/01/2015 Modification : 28/06/2024 Page 1 sur 5

Stratégie d'échantillonnage pour les mesures biologiques des sols

Conditions de prélèvement

L'objectif de ce mode opératoire est de décrire les modalités de prélèvement des échantillons de sol **représentatifs** du modèle d'étude (parcelle, point...), afin de pouvoir analyser et stocker les échantillons au sein de la plateforme Biochem-Env. Ces échantillons doivent être représentatifs de l'état du milieu. Les conditions optimales sont un sol pas trop humide ni trop sec, après 3-4 jours de beau temps, non gelé. (Température minimale dans le sol : 5 °C).

De plus, les prélèvements doivent être réalisés dans des conditions optimisées pour éviter la contamination des échantillons entre eux. Pour cela, il est nécessaire de :

- Utiliser du matériel propre, lavé à l'eau au préalable
- Enlever au maximum la terre restant sur la tarière entre chaque traitement afin d'éviter la contamination avec le traitement suivant
- Laver le matériel dès lors que l'on change de site de prélèvement (type de sol différent)

Le prélèvement est réalisé à un moment de référence indépendant des perturbations liées aux pratiques culturales (labour, fertilisation, semis, binages).

L'activité biologique est maximale dans l'horizon de surface et décroît plus ou moins rapidement avec la profondeur.

La technique d'échantillonnage dépend donc des objectifs de l'étude. Sur les sites d'agroécosystèmes, le prélèvement se réalise sur la profondeur du labour sans dépasser 20 cm, en ayant préalablement éliminé la couverture végétale, la litière, les racines apparentes.

En cas de non travail du sol ou travail superficiel, il est recommandé de prélever sur un horizon de 0-10 cm, voir 0-5 cm en fonction des projets.

	Rédacteur(s)	Vérificateur(s)	Approbateur(s)
Nom :	Touil Nadine	Christie Mougin	Christie Mougin
Mia :			

Des prélèvements adaptés aux paramètres à mesurer

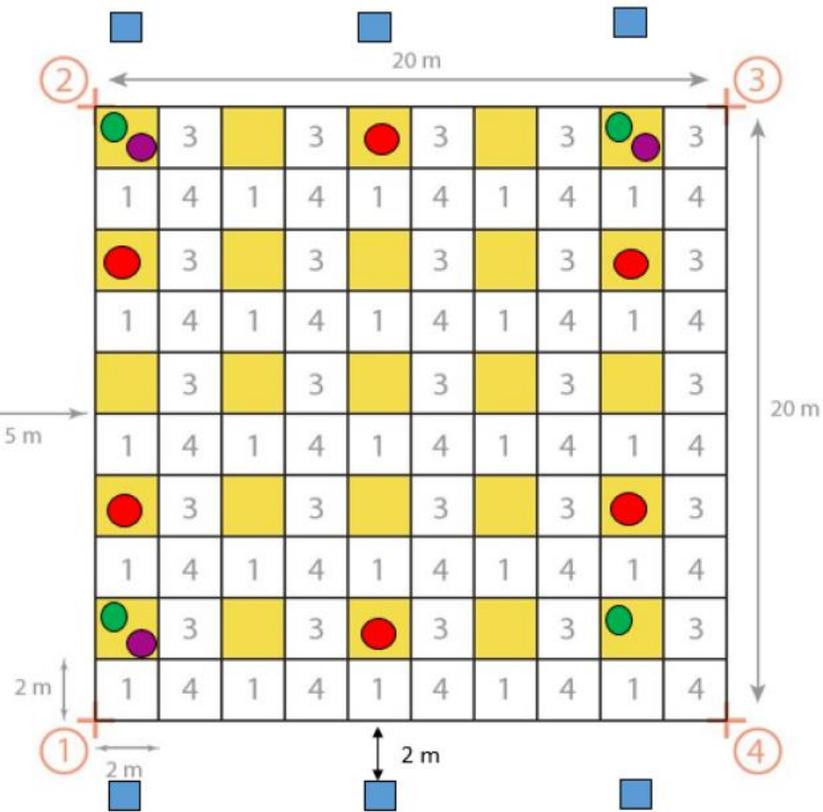


Stratégie d'échantillonnage spatiale

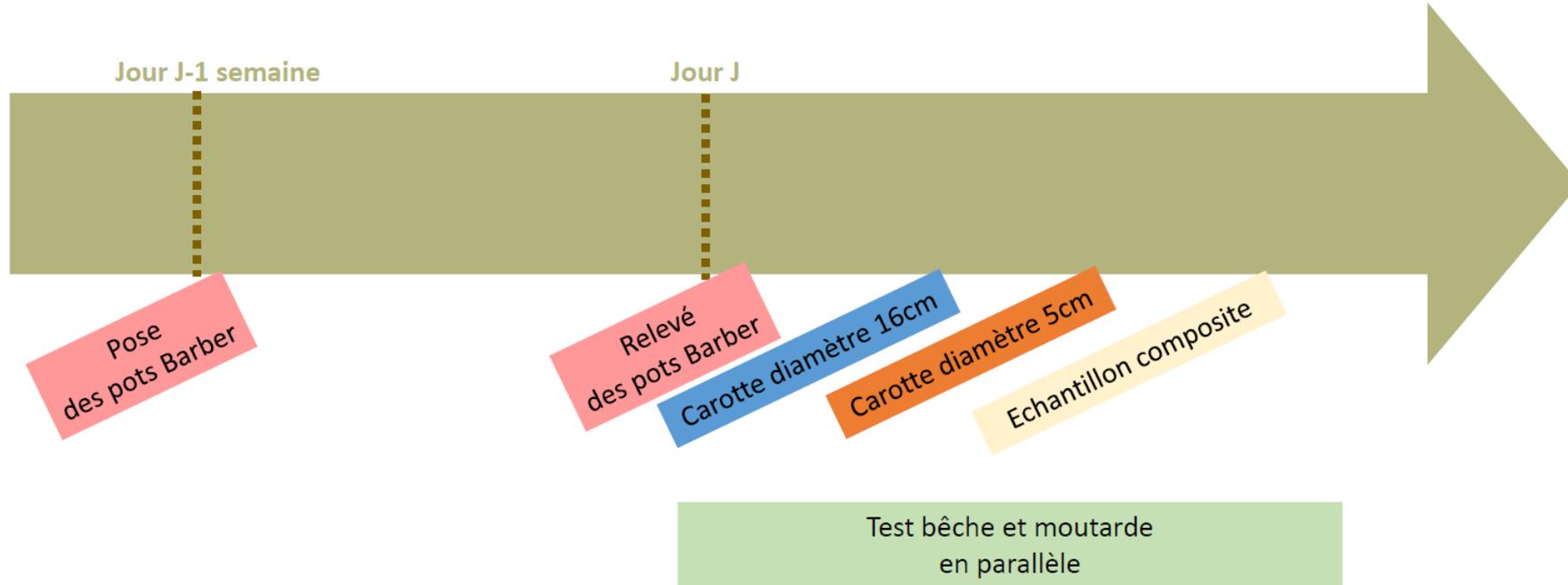
Proposition : sur le site d'échantillonnage du RMQS

-  Pot Barber
-  Prélèvement pour l'échantillon composite
-  Carottage (diam. 5 cm) pour la mésofaune
-  Carottage (diam. 15 cm) pour la porosité
-  Test bêche et application de moutarde

Fosse pédologique
5 m



Stratégie d'échantillonnage temporelle



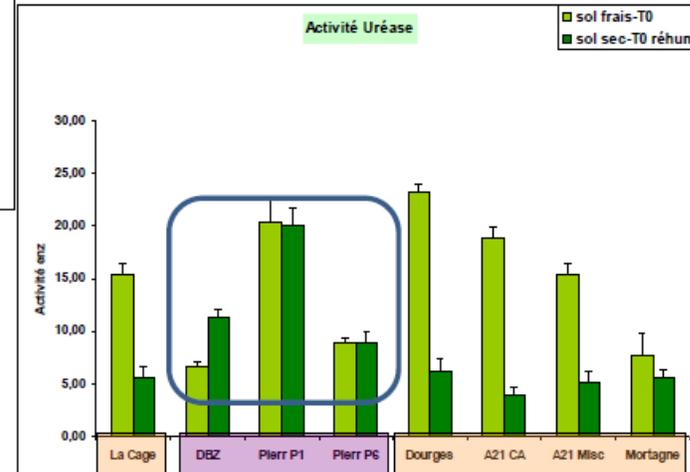
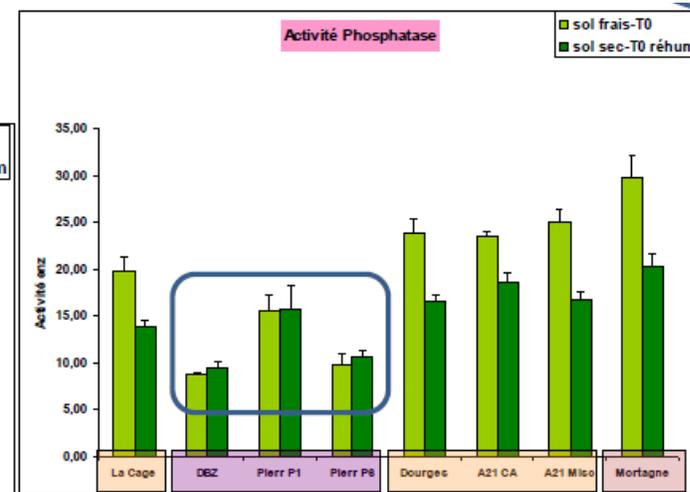
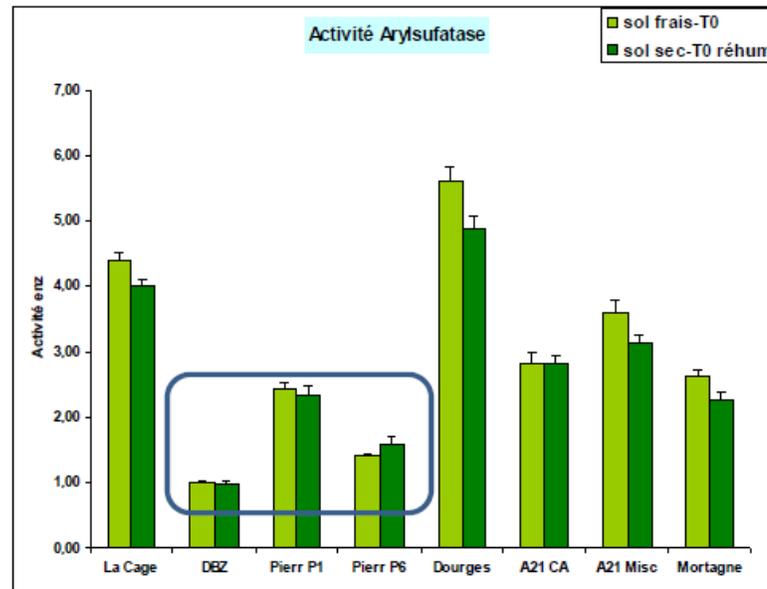
Conservation des échantillons de sols vs activités enzymatiques

SOILS	STORAGE	TIME (day)	ARYLS	PHOS	GLU	URE	
LNC (% evolution of activity from fresh soil)	fresh (mU/g dw)		4.39	19.83	9.77	6.34	
	dry 5 weeks and rewetted 80%WRC	0	91	70*	99	36*	
		1	82*	76*	100	88	
		2	90	100	126*	106	
		4	73*	78*	120*	83*	
		7	82*	89	117*	82*	
		11	81*	88	113*	78*	
	Stored at 4 °C	15	78*	78*	121*	84*	
		3	100	107	134*	97	
		6	103	110	134*	88	
		9	102	110	159*	91	
		15	95	102	118*	26*	
		30	85*	98	112	43*	
	Frozen at -20 °C	60	94	101	125*	83*	
		15	90	89	109	69*	
		30	80	88	124*	79*	
	ultrafreeze at -80 °C	60	89	85*	119*	56*	
		15	92	113*	123*	78*	
		30	94	90	143*	78*	
			60	98	107	130*	58*



Conservation des échantillons vs activités enzymatiques

Sec vs réhumidifié



Sols limono argileux
 Sols sableux



Des préconisations (conservation) ISO 18400-206

Test objective	International Standard	Wet 4 °C days/months	Wet -20 °C ^a years	Wet -80 °C or liquid nitrogen (-180 °C) ^a years
Effects on invertebrates	ISO 11267 ISO 11268-1 ISO 11268-2 ISO 15952 ISO 16387 ISO 17512-1 ISO 17512-2 ISO 20963	three months	—	—
Effects on higher plants	ISO 11269-1 ISO 11269-2 ISO 17126 ISO 18763 ISO 22030 ISO 29200	three months	—	—
Phospholipid Fatty Acid, Phospholipid ether lipids	ISO/TS 29843-1 ISO/TS 29843-2	7 d	2	10
DNA	ISO 11063	—	2	10
RNA ^[13]		—	—	10

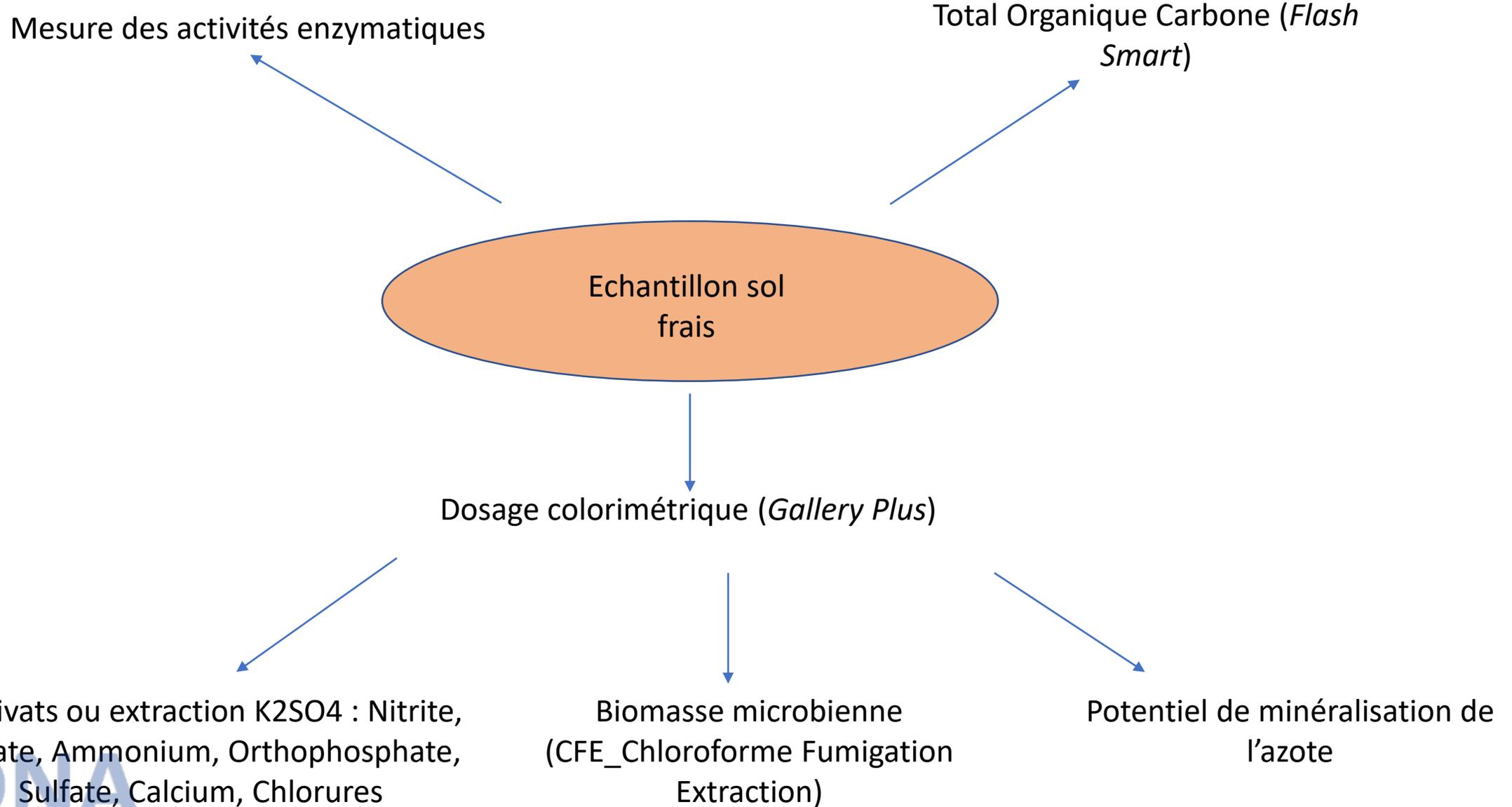


Des préconisations (conservation) ISO 18400-206

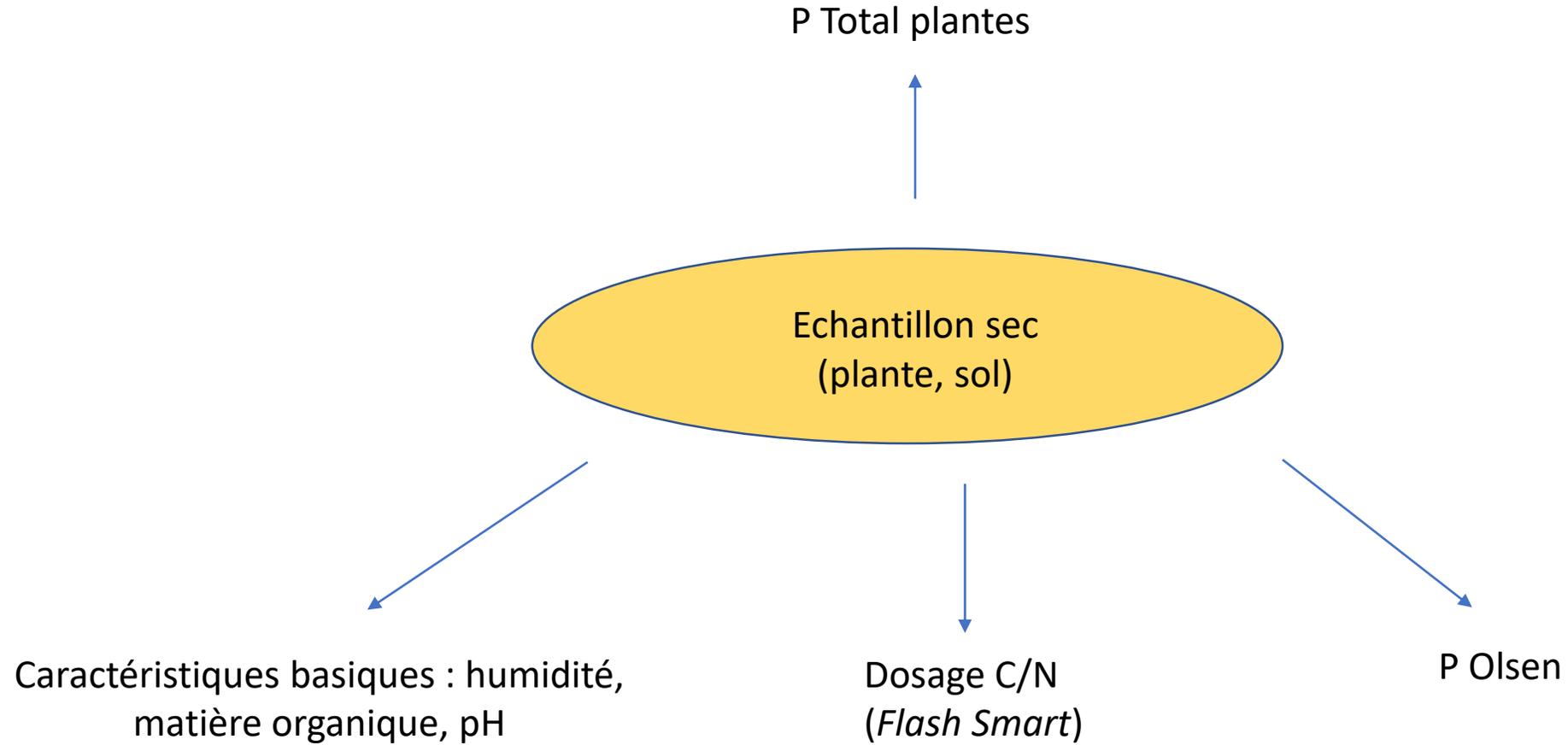
Test objective	International Standard	Wet 4 °C days/months	Wet -20 °C ^a years	Wet -80 °C or liquid nitrogen (-180 °C) ^a years
Biomass				
— substrate-induce respiration method	ISO 14240-1	7 d	1	—
— Fumigation-extraction method	ISO 14240-2			
Potential ammonium oxidation	ISO 15685	7 d	1	—
Nitrogen mineralization	ISO 14238	7 d	1	—
Microbial soil respiration	ISO 16072	7 d	1	—
Soil respiration curves	ISO 17155	7 d	—	—
Dehydrogenase activity	ISO 23753-1 ISO 23753-2 ISO 18187	7 d	1	—
Enzyme activity patterns ^[14]	ISO/TS 22939 ISO 20130	15 °C / 4 d	—	≥ 4 month
Denitrifying enzyme activity	ISO 20131-1 ISO 20131-2	7 d	1	—



Analyses possibles en fonction de la conservation



Analyses possibles en fonction de la conservation



La génomique environnementale

- **Les acides nucléiques environnementaux (ANe) :**

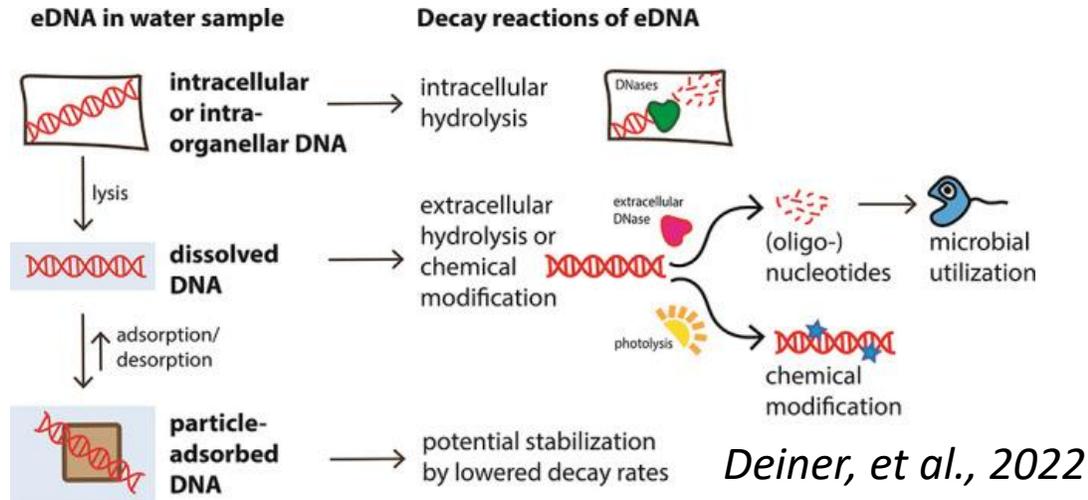
Un mélange complexe d'ADN et d'ARN, libres ou complexés, pouvant être isolés d'une matrice environnementale. Ils proviennent des différents organismes vivant ou ayant vécu dans l'écosystème étudié. *Modifié de Taberlet, et al., 2012 et 2018*

- **La génomique environnementale :**

Elle désigne l'ensemble des informations pouvant être acquise sur les organismes et les écosystèmes présents et passés par l'analyse de la séquence, de génomes, de métagénomes et de l'expression de gènes. *La génomique environnementale, Faure, Joly, 2016*

Principales caractéristiques des ANe

- Les ANe, des molécules éphémères



- Et informatives mais à différentes échelles

Régional	Glace profonde	Air
		Eau de mer Sédiments fluviatiles/marins Eau fluviatile
Local	Sols argileux	Eau lacustre Sédiments lacustres Sols de surface Litière
	Sols profonds	Neige Tissus/Sang/fèces
	Passé	Présent

Modifié de Deiner, et al., 2017

Quelques questions pour orienter l'échantillonnage

L'Objectif de l'étude :

Renaturation ? Bio invasion ? Diagnostic ? Communautés ? Régimes alimentaires ? ...

Permet d'orienter vers une approche espèce spécifique ou généraliste ainsi que d'orienter les analyses subséquentes (inventaire, fonctionnelles, spatiales etc...)

Que recherche t-on ?

Une espèce ? Une abondance ? Une diversité ?

Permet également d'orienter vers une approche espèce spécifique ou généraliste

Mais aussi de concevoir un échantillonnage adapté

Dans quels milieux ?

Aquatiques ? Terrestres ? Un hôte ? Aérien ? ...

Permet de définir le type de matrice environnementale sur laquelle travailler

Quand le recherche t-on ?

Présence récente ? Contemporaine ? Ancienne ? Une dynamique ?

Permet de définir l'échantillonnage dans le temps (cinétique de prélèvements) et l'espace (profondeur/volume)

Quelques questions pour orienter l'échantillonnage

Une dépendance à la saisonnalité ?

Pic d'activité (pollinisation, sporulation, reproduction, etc..)

Permet de savoir quand prélever

Mode de vie ?

Régime alimentaire ? Mode de vie caché ? Fixe/mobile ? Diurne/nocturne ?

Affine la période de prélèvement

Capacité de dispersion ?

Quelques cm ? m ? km ?

Sélection de la technique d'échantillonnage et du volume (sol, eau, ...)

Historique du site ?

Pollution ? Anthropisation ? Aléas climatiques ?

Va impacter la faune et la flore, les fonctions écosystémiques, etc.

Les aléas climatiques (pluie, sécheresse, etc.) impacteront la campagne d'échantillonnage

Attention aux contaminations !

Port de gants fortement recommandé ainsi que l'utilisation de **matériel stérile, unitaire ou décontaminé**.

➤ Décontaminer entre chaque prélèvements ou sites (si échantillons composites).

- **Outils de décontamination**

Alcool : fixe les cellules, mais sans les détruire

Javel : Destruction des membranes et débris cellulaires

UV : fragmentation des ANe

Flamme : Destruction ANe

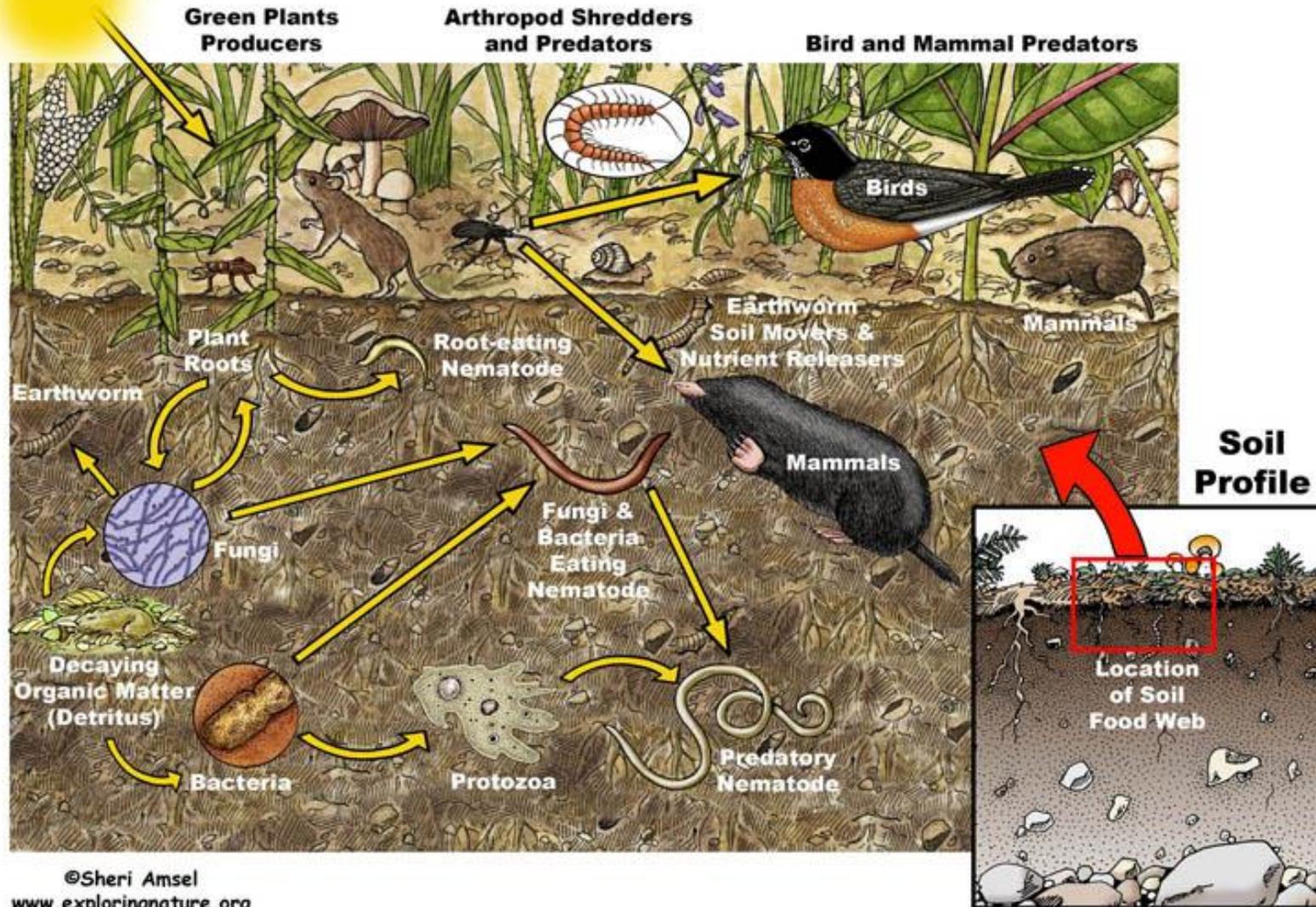
DNases et RNases : Destruction des ANe



Complément pour l'échantillonnage de sols

Tenir compte de la **capacité de dispersion** des organismes:

Soil Food Web



Exemple : Le prélèvement d'eau par filtration

- Conditions de prélèvement (liquide)

- Matériel



Caractéristiques des membranes :
Hydrophile, 0,45 μm , PES ou NC (le plus courant)

- Prélèvement



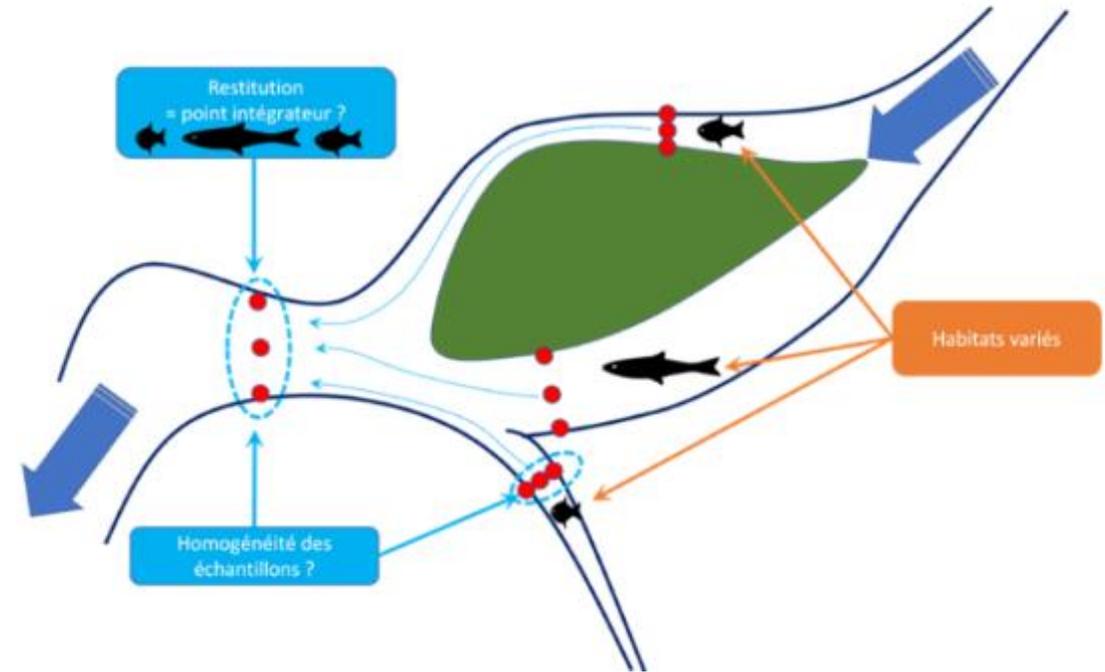
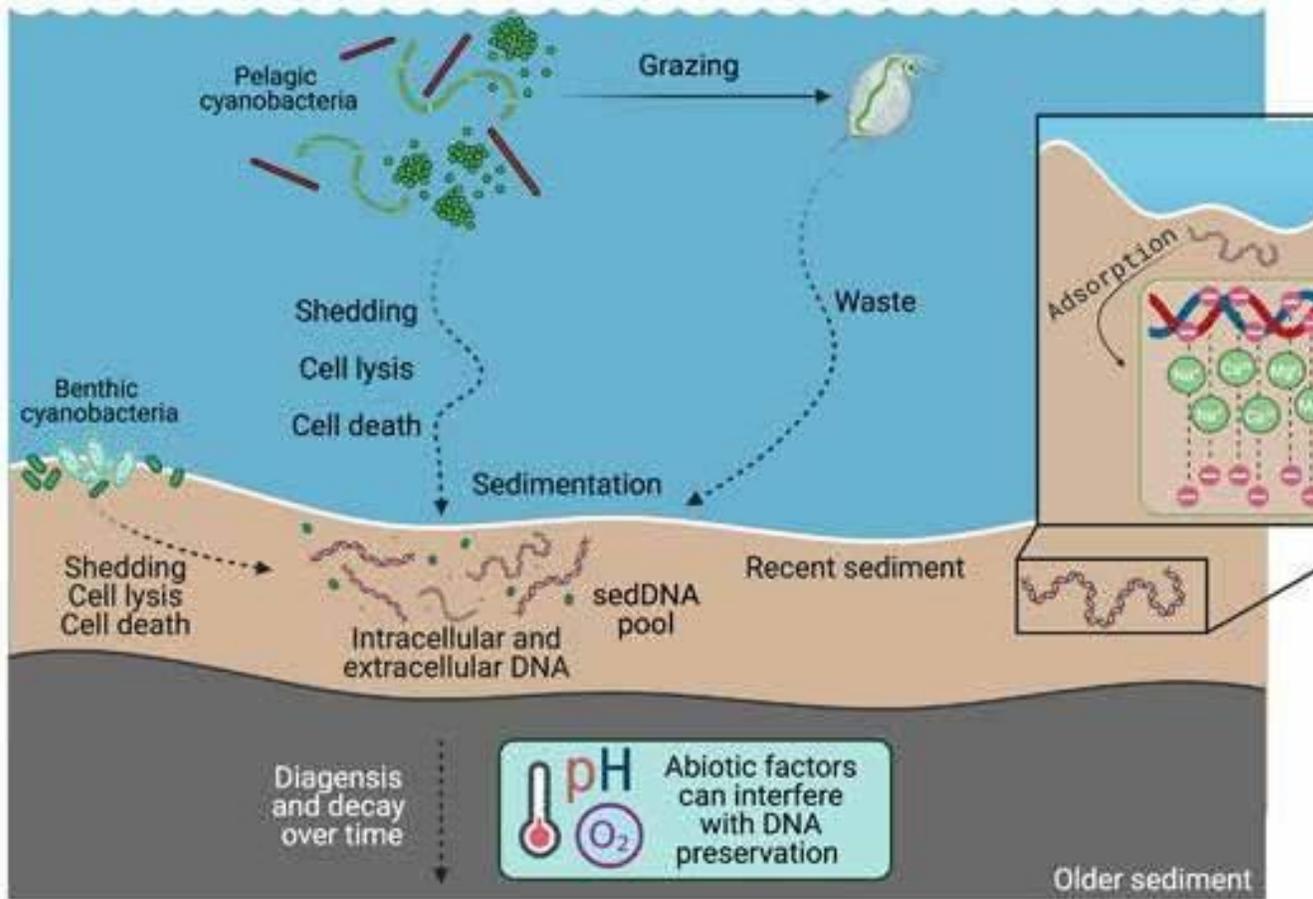
Keonhee, et al., 2021



➤ Favoriser le prélèvement à effort constant (même volume ou durée)

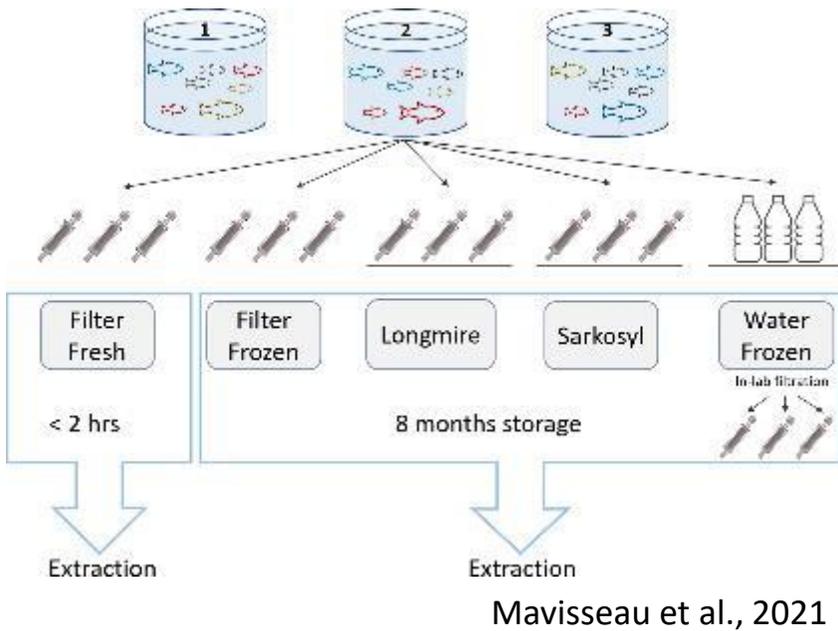
Dynamique spatiale et temporelle des ANe dans l'eau

Prélever de l'aval vers l'amont en positionnant le dispositif à contre courant:



Conservation des échantillons

Liquides



- Précipitation (Alcool)
- Solutions tampon
- Lyophilisation
- Membranes filtrantes en Longmire

Solides



- Sols frais
- Congélation
- Lyophilisation

Tissus



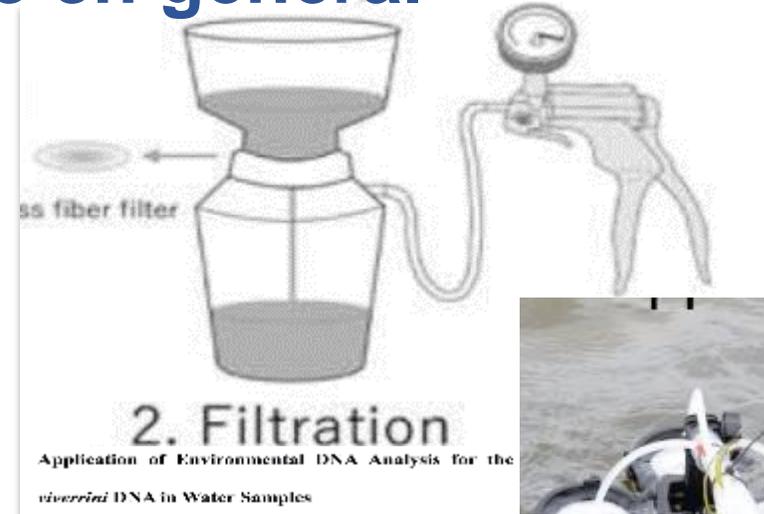
- Solutions tampon
- Alcool
- Atmosphère contrôlée

Le prélèvement d'ADNe en général



DEVELOPMENT AND APPLICATION OF AN eDNA METHOD TO DETECT AND QUANTIFY A PATHOGENIC PARASITE IN AQUATIC ECOSYSTEMS

J. R. Huver¹, J. Koprivnikar², P. J. Johnson³, S. S. Swamy⁴



➤ **Un manque de standardisation dans la littérature...**

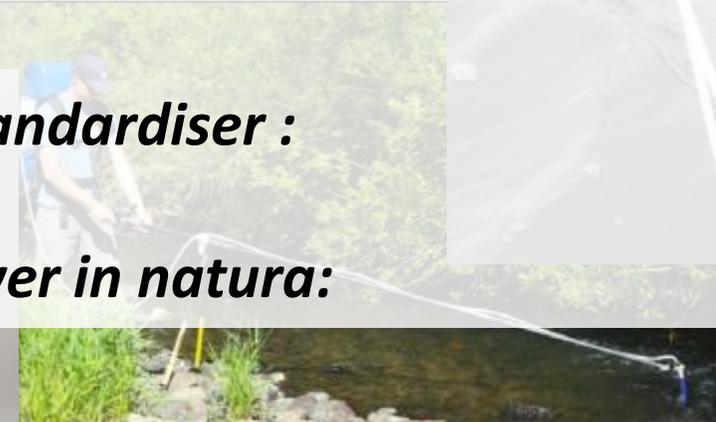
*Mais des projets et initiatives en cours pour standardiser :
PEPR OneWater, OFB, LNE...*

Et des normes existantes sur lesquelles s'appuyer in natura:



Molecular detection of marine nematodes from environmental samples: overcoming eukaryotic interference

Punyaslake Bhadury^{1,2,3,*}, Melanie C. Austen¹, David T. Bilton¹, P. John D. Lambshead², Alex D. Rogers^{4,5}, Gary R. Smerdon¹



ENVIRONIUM™: A fully integrated environmental DNA sampling system

Christen C. Thomas¹, Jesse Howard¹, Phong L. Nguyen¹, Tracie A. Seimon², Loren S. Goldberg³



Quand nous contacter ?

Déroulement d'un projet classique :

Collaboration

Prestation

Conception

Soumission

Echantillonnage

Expérimentation

Analyses

Restitution

Financement de CDD possible
Meilleur accompagnement
Meilleure planification

Le plus tôt sera le mieux !

Quelques liens utiles

- Plateforme Biochem-Env
 - <https://www.biochemenv.fr/>
 - contact-biochemenv@inrae.fr
- Plateforme eDNA
 - edna-anaee@univ-grenoble-alpes.fr
- Infrastructure AnaEE-France
 - <https://www.anaee-france.fr/>
- Infrastructure RARe
 - <https://www.agrobrc-rare.org/>
- Pilier environnement : contact-brc4env@inrae.fr
- RESPIRE (CNRS)
 - <https://extra.core-cloud.net/collaborations/RESPIRE/SitePages/Accueil.aspx>



L'importance d'AnaEE et des IR



France



Montage de projet multi-plateformes, coordination
Veille sur les opportunités de financements PEPR, Biodiversa, Horizon ...

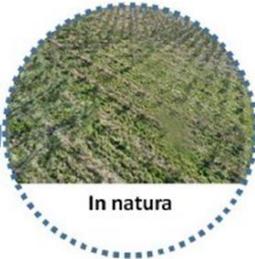
Experimental platforms



Ecotrons



Semi-natural



In natura

Analysis and measurements

Information systems and models



Instruments



In silico

Shared activities

- Access rules
- Shared protocols
- Technologies
- Metadata semantics
- Data ontology
- Syntheses

- Offrir un accès complet à l'étude d'écosystèmes continentaux terrestres et aquatiques.

- 36 dispositifs en France :

- Plateformes écosystémiques *in natura*
- Plateformes écosystémiques fermées
- Plateformes analytiques
- Plateformes de modélisation



Les principales missions d'AnaEE France

Expérimental

Analytique



Quelques textes ISO

- 18400-101 - Qualité du sol - Échantillonnage - Partie 101 : Cadre pour la préparation et l'application d'un plan d'échantillonnage
- 18400-102 - Qualité du sol - Échantillonnage - Partie 102 : Choix et application des techniques d'échantillonnage
- 18400-104 - Qualité du sol - Échantillonnage - Partie 104 : Stratégies
- 18400-105 - Qualité du sol - Échantillonnage - Partie 105 : Emballage, transport, stockage et conservation des échantillons
- 18400-107 - Qualité du sol — Échantillonnage - Partie 107 : Enregistrement et notification
- 18400-202 - Qualité du sol — Échantillonnage - Partie 202 : Investigations préliminaires
- 18400-205 - Qualité du sol — Échantillonnage - Partie 205 : Recommandations relatives aux modes opératoires d'investigation des sites naturels, quasi naturels et cultivés
- 18400-206 - Qualité du sol — Échantillonnage - Partie 206 : Collecte, manipulation et conservation de sols destinés à l'évaluation de paramètres biologiques fonctionnels et structurels en laboratoire



Merci pour votre attention !