



Université du Québec
à Rimouski

Facteurs limitant et améliorant la détection d'ADN environnemental dans les sédiments marins

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

PAR

© **Laury-Ann Dumoulin**

Mai 2023

Composition du jury :

Réjean Tremblay, président du jury, Université du Québec à Rimouski

Richard Saint-Louis, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski

Geneviève Parent, codirectrice de recherche, Pêches et Océans Canada

Nellie Gagné, examinatrice externe, Pêches et Océans Canada

Dépôt initial le 19 décembre 2022

Dépôt final le 29 mai 2023

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

« Dans la vie,
rien n'est à craindre,
tout est à comprendre »

Marie Curie

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Geneviève J. Parent et Richard Saint-Louis pour avoir cru en moi au cours des deux dernières années menant à la réalisation de ce projet de recherche. Merci de m'avoir accordé votre confiance, et surtout merci pour vos conseils, vos disponibilités et vos commentaires constructifs qui m'ont permis d'apprendre et de m'améliorer.

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce projet, votre aide fut inestimable. Je remercie plus spécifiquement l'équipe de génomique de l'Institut Maurice-Lamontagne qui m'a accueilli en 2019 pour un stage estival et qui a continué de croire en moi. Merci à Geneviève J. Parent, Marion Chevrinais, Jade Larrivière, Audrey Bourret, Ariane Thérien, Grégoire Cortial et Éric Parent de m'avoir soutenu dans ce projet de recherche autant en ce qui concerne l'aspect pratique que pour avoir été d'un soutien moral exceptionnel. Par la même occasion, je souhaite personnellement remercier Cloé Lepage pour son dévouement envers mon projet de recherche.

À l'Université du Québec à Rimouski, mes remerciements vont à Steeven Ouellet et Marie-Ève Anglehart pour leur conseil et leur disponibilité. Merci à Coralie Lebreux, Gabriel Côté et David Simard pour l'aide précieuse en début de projet. J'aimerais également remercier le professeur Jean-Pierre Gagné pour ses conseils quant à la méthodologie. Merci à toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont aidé à réaliser ce projet de recherche.

Je remercie également les Fonds de recherche du Québec – Nature et Technologies qui ont soutenu financièrement ce projet par le biais d'une bourse de maîtrise en recherche. Je remercie également Québec-Océan pour les bourses d'études et de déplacement.

Je voudrais remercier sincèrement mes parents, ma sœur et mes grands-parents pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de mes études. Je tiens également à remercier mon conjoint pour son écoute, son aide et son support sans faille.

AVANT-PROPOS

L'ADN environnemental (ADNe) est un domaine émergent pour lequel j'ai développé un intérêt en 2019 lors d'un stage à l'Institut Maurice Lamontagne dans le cadre de mon baccalauréat en chimie de l'environnement et des bioressources. À travers l'ADNe, j'ai pu développer mes compétences théoriques et pratiques dans les domaines de la chimie et de la biologie lors des deux années qui ont suivi. Par la suite, j'ai choisi de réaliser une maîtrise sur l'ADNe dans les sédiments marins. Cette matrice, encore peu étudiée à ce jour, constitue le plus grand réservoir de matériel génétique au monde en plus de posséder des conditions propices à la préservation de l'ADN. Les sédiments marins sont connus pour contenir des inhibiteurs pouvant réduire la capacité de détection de l'ADNe. Ainsi, mon projet de recherche vise à mieux comprendre les facteurs qui limitent la détectabilité de l'ADN dans une matrice sédimentaire. J'utilise une matrice traitée chimiquement pour évaluer individuellement l'effet de la granulométrie et d'inhibiteurs, plus spécifiquement des ions métalliques (calcium, cuivre, fer et manganèse) et des acides humiques, sur la détectabilité de l'ADN. L'effet des inhibiteurs étudiés est connu quant à la réaction de polymérisation en chaîne ce qui n'est toutefois pas représentatif des conditions réelles auxquelles sont soumis les échantillons environnementaux traités pour la détection d'ADNe.

RÉSUMÉ

L'ADN environnemental (ADNe) est un domaine émergent dont les approches se développent pour répondre à des besoins en termes de programmes de surveillance et de gestion environnementale. Alors que de plus en plus de lignes directrices concernant l'utilisation et la standardisation des méthodes en ADNe sont développées, les facteurs influençant la détectabilité du matériel génétique dans l'environnement sont encore, à ce jour, peu étudiés.

Le présent projet de recherche a pour objectif de caractériser l'effet de facteurs tels que la granulométrie des sédiments, la concentration d'acides humiques et d'ions métalliques (calcium, cuivre, fer, manganèse) sur la détectabilité de l'ADN dans les sédiments marins.

Ce mémoire fait mention de l'effet de ces facteurs directement dans une matrice sédimentaire pour reproduire les conditions utilisées pour traiter un échantillon naturel alors que la majorité des inhibiteurs connus à ce jour ont été identifiés par leurs effets sur la réaction de polymérase en chaîne (PCR). La matrice sédimentaire fut traitée chimiquement pour retirer les acides humiques, les acides fulviques, les ions métalliques labiles ainsi que les composés phénoliques. Ce faisant, une approche contrôlée a pu être utilisée pour évaluer individuellement l'influence des facteurs ciblés sur la détectabilité de l'ADN exogène ajouté en quantité connue dans la matrice.

Les résultats ont permis d'identifier des facteurs qui limitent (calcium, fer et manganèse) ainsi que des facteurs qui améliorent (cuivre et acides humiques) la détectabilité de l'ADN dans les sédiments. Notamment, les résultats identifient pour la première fois l'effet limitant du manganèse et confirment que la présence dans l'environnement du calcium et du fer tend à réduire la détectabilité de l'ADNe alors que leur effet inhibiteur avait été identifié en PCR. L'acide éthylènediaminetétraacétique a été utilisé pour évaluer le potentiel d'un chélatant résultant en une amélioration de la détectabilité de l'ADN pouvant potentiellement appuyer l'hypothèse soulevée quant à l'effet de l'ajout d'acides humiques.

Ces travaux de recherche clarifient de nouvelles limites pour l'interprétation des données et suggèrent des pistes pour améliorer la détection d'ADNe tout en présentant le besoin de plus de tests pour mieux comprendre l'ensemble des facteurs qui influencent la détectabilité de l'ADN dans l'environnement.

Mots clés : ADNe, inhibiteurs, sédiments marins, ions métalliques, acides humiques, granulométrie, acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA)

ABSTRACT

Environmental DNA (eDNA) is an emerging field in which approaches are developing to answer needs in terms of monitoring and environmental management. While more and more guidelines concerning the use and standardization of eDNA methods are developed, the factors influencing the detectability of genetic material in the environment are still, to date, poorly studied.

This research project aims to characterize the effect of factors such as sediment particle sizes, concentration of humic acids and metal ions (calcium, copper, iron, manganese) on DNA detectability in marine sediments.

This thesis reports the effect of these factors directly in a sedimentary matrix to reproduce the conditions used to treat natural samples, whereas most inhibitors known to date have been identified by their effects on the polymerase chain reaction (PCR). The sedimentary matrix was chemically treated to remove humic acids, fulvic acids, labile metal ions and phenolic compounds. In doing so, a reductive approach was used to individually assess the influence of the targeted factors on the detectability of exogenous DNA added in a known amount in the matrix.

The results made it possible to identify factors that limit (calcium, iron and manganese) as well as factors that improve (copper and humic acids) the DNA detectability in sediments. Moreover, the results identify for the first time the limiting effect of manganese and confirm that the presence in the environment of calcium and iron tends to reduce the detectability of eDNA whereas their inhibitory effect had been identified in PCR. Ethylenediaminetetraacetic acid was used to evaluate the potential of a chelating agent resulting in an improvement in DNA detectability which could potentially support the hypothesis raised as to the effect of the addition of humic acids.

This research clarifies new limitations for data interpretation and suggests ways to improve eDNA detection while presenting the need for more tests to better understand all the factors that influence DNA detectability.

Keywords: eDNA, marine sediments, metal ions, humic acids, granulometry, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ix
AVANT-PROPOS.....	xi
RÉSUMÉ.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
TABLE DES MATIÈRES.....	xvii
LISTE DES TABLEAUX.....	xix
LISTE DES FIGURES.....	xxi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	3
CHAPITRE 1.....	37
1.1 RESUME.....	37
1.2 MISE EN CONTEXTE.....	37
Substances humiques.....	39
Ions métalliques.....	41
Composés phénoliques.....	41
1.3 OBJECTIF.....	42
1.4 MÉTHODOLOGIE.....	42
Échantillonnage de sédiments.....	43
Prétraitement de la matrice sédimentaire.....	44
Extractions des ions métalliques labiles.....	45
Extraction des acides humiques et fulviques.....	45
Extraction des composés phénoliques.....	46
1.5 DISCUSSION.....	47
1.6 CONCLUSION.....	50

CHAPITRE 2	52
2.1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DU PREMIER ARTICLE	53
2.2 FACTORS LIMITING OR ENHANCING ENVIRONMENTAL DNA DETECTION IN MARINE SEDIMENTS	54
2.3 ABSTRACT	55
1. INTRODUCTION	56
2. MATERIAL AND METHODS	58
2.1 Sampling and sediments granulometry	58
2.2 Sequential extractions procedure on sediments and mineral composition analysis	59
2.3 Preparation of sediment aliquots for experiments	60
2.4 DNA extraction and qPCR detections	62
2.5 Statistical analyses	64
3. RESULTS	64
3.1 Sediments characteristics prior and following chemical treatments	64
3.2 Factors affecting DNA detectability	65
4. DISCUSSION	71
4.1 Granulometry	71
4.2 Compounds limiting eDNA detections in marine sediments	71
4.3 Compounds enhancing eDNA detections from marine sediments	73
4.4 Improvements of eDNA detections in the future	75
5. ACKNOWLEDGEMENTS	77
6. SUPPLEMENTARY MATERIAL	78
6.1 Appendix 1	78
6.2 Appendix 2	79
CONCLUSION GÉNÉRALE	81
ANNEXE I	85
ANNEXE 2	88
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principales composantes d'une PCR.	14
Tableau 2. Classification de la taille de particules.....	23
Table 3. Number of replicates of treated sediments used for each factor affecting environmental DNA detections. The proportions of sediments used from Anse Wilson (first) and Baie des Cochons (second) are presented as columns.	61
Table 4. Concentrations of compound added to sediment aliquots. The artificial seawater contained calcium ($110 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) but none of the other compounds.	78
Tableau 5. Concentrations en ions métalliques des sédiments naturels extraits à l'acide chlorhydrique 1M et analysés au MP-AES.....	88

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation d'un brin d'ADN composé des quatre désoxyribonucléotides.....	6
Figure 2. Exemple d'une procédure d'extraction d'ADN de la compagnie QIAGEN pour la trousse DNeasy® PowerSoil DNA Extraction. (Adaptée de QIAGEN, 2020).....	12
Figure 3. Étapes d'une PCR (Inspirée de ThermoFisher Scientific, s.d. b).....	15
Figure 4. Complémentarité des acides nucléiques.....	15
Figure 5. Exemple de courbe d'amplification générée par PCR quantitative. Le tracé vert correspond à l'intensité de fluorescence détectée en fonction du nombre de cycle d'amplification alors que la ligne horizontale bleue correspond à la valeur seuil arbitraire de fluorescence) (Réalisé avec le logiciel Agilent Aria 1.71 d'Agilent Technologies).	19
Figure 6. Résumé des principaux inhibiteurs connus à ce jour (Réalisé à partir de Matheson <i>et al.</i> , 2010 ; Schrader <i>et al.</i> , 2012 ; PCR detection of microbial pathogens, 2013 ; Combs <i>et al.</i> , 2015 ; Sutlovic <i>et al.</i> , 2015 ; Lance and Guan, 2020 ; Uchii <i>et al.</i> , 2019 ; Beng <i>et al.</i> , 2020 ; Sidsted <i>et al.</i> , 2020 ; Kuffel <i>et al.</i> , 2021 ; Pawlowski <i>et al.</i> , 2021).	34
Figure 7. Protocole d'extraction des substances humiques sédimentaires (d'après Swift, 1996) repris de Tremblay (2003).	40
Figure 8. Carte du Parc national du Bic présentant les deux sites d'échantillonnages (Réalisée avec QGIS 3.18).	44
Figure 9. Procédure d'extractions chimiques ciblées pour traiter les sédiments réalisée sur des sédiments secs et tamisés. La flèche horizontale (phase solide) correspond aux traitements séquentiels des sédiments alors que la flèche verticale (phase liquide) indique les composés extraits et écartés lors des extractions.	47
Figure 10. Sequential extractions procedure realized on sieved dry sediments. The solid phase arrow corresponds to the sequential treatments of sediments while the liquid phase arrow indicates the compounds extracted and discarded in some treatments.....	60
Figure 11. Mineral composition of chemically treated sediments from the samples collected at two sites.	65
Figure 12. Effect of granulometry from the sedimentary matrix on the DNA detectability. Sediments were mainly composed of silt and sand. The mean and standard error are presented. The dash line represents the linear mixed-effect model of silt proportion on exogenous DNA detected.	66

Figure 13. Effect of metal ions concentrations on the DNA detectability. The mean and standard error are presented. Letters indicate differences according to $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis nonparametric test followed by a post hoc Dunn test)..... 68

Figure 14. Effect of humic acids concentrations on the DNA detectability. The mean and standard error presented. Letters indicate differences according to $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis nonparametric test followed by a post hoc Dunn test) 69

Figure 15. Effect of EDTA concentrations on the DNA detectability. The mean and standard error presented. Letters indicate differences according to $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis nonparametric test followed by a post hoc Dunn test) 70

Figure 16. Effect of sodium concentrations on the DNA detectability. The mean and standard error are presented. Letters indicate differences according to $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis nonparametric test followed by a post hoc Dunn test). 79

Figure 17. Procédure détaillée du traitement chimique effectuée sur des sédiments par une séquence d'extractions ciblées 85

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNe	ADN environnemental (<i>eDNA : environmental DNA</i>)
AH	Acides humiques
ASB	Albumine de sérum bovin (<i>BSA: Bovine serum albumin</i>)
CO1	Cytochrome c oxydase 1
CPI	Contrôle positif interne (<i>IPC : internal positive control</i>)
Cq	<i>Quantification cycle</i> , cycle de quantification
CSA	<i>Canadian Standards Association</i> , Association Canadienne de normalisation
CTAB	Bromure de cétrimonium
DCM	Dichlorométhane
DNase	Désoxyribonucléase
dNTPs	Désoxyribonucléotides triphosphates
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ENC	<i>Extraction negative control</i>
HCl	Acide chlorhydrique
IHSS	<i>International Humic Substances Society</i> , Société internationale des substances humiques
LD	Limite de détection (<i>LOD: Limit of detection</i>)
MGB	<i>Minor groove binding</i>

MRC	Matériau de référence certifiée
NaOH	Hydroxyde de sodium
NFQ	<i>Non Fluorescent Quencher</i> , molécule d'extinction non-fluorescente
OFEV	Office fédéral de l'environnement de la Confédération suisse
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Réaction de polymérisation en chaîne
qPCR	<i>Quantitative PCR</i> , PCR quantitative
RPM	Rotation par minutes
s.d.	Sans date
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i> , Dodécylsulfate de sodium
XRD	<i>X-ray diffraction</i>

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Au cours des dernières décennies, plusieurs approches innovatrices de détection d'ADN environnemental (ADNe) ont émergé pour répondre à des besoins de surveillance et de gestion environnementale (Goldberg *et al.*, 2016 ; Baillie *et al.*, 2019 ; Thaling *et al.*, 2021). Les approches de détection d'ADNe ont pour avantages d'être non destructrices et parfois plus sensibles comparativement aux méthodes traditionnelles (p. ex. pêche électrique, chalut, seine ; Thomsen et Willerslev, 2015 ; Harrison *et al.*, 2019 ; De Brauwer *et al.*, 2022a). En ce sens, elles permettent d'accroître la portée des sorties de terrain en ce qui concerne la détection des espèces rares (Goldberg *et al.*, 2016 ; Baillie *et al.*, 2019). Ces méthodes sont également en voie de devenir indispensables pour la détection précoce d'espèces envahissantes, entre autres pour limiter les coûts associés à leur contrôle ou à leur élimination (Buxton *et al.*, 2017 ; Roux *et al.*, 2020 ; Sepulveda *et al.*, 2020).

La première référence à l'ADNe pour désigner le matériel génétique collecté dans l'environnement est apparue il y a plus de 35 ans dans le cadre d'une recherche ayant pour objectif l'extraction et la purification de l'ADN microbien à partir de sédiments (Ogram *et al.*, 1987 ; Taberlet *et al.*, 2012). Dans les dernières années, en Amérique du Nord ainsi qu'en Europe, deux réseaux d'une centaine de scientifiques, respectivement Pathway to Increase Standards and Competency of eDNA Surveys (PISCeS) et DNAqua-Net, ont été créés afin d'accroître la fiabilité des approches de détection en ADNe dans une variété d'environnements (Loeza-Quintana *et al.*, 2020 ; dnaqua.net). Plus récemment, des recommandations nationales ont été établies quant à l'utilisation et la standardisation de l'ADNe notamment au Canada (CSA, 2021 ; Abbott *et al.*, 2021), en Suisse (Pawlowski *et al.*, 2020), en Europe (Bruce *et al.*, 2021) ainsi qu'en Nouvelle-Zélande et en Australie (De Brauwer *et al.*, 2022a, De Brauwer *et al.*, 2022b). Pour le ministère des Pêches et Océans Canada, le développement et la standardisation des approches de détection sont une priorité ministérielle afin d'utiliser de manière robuste l'ADNe pour détecter les espèces rares (Baillie *et al.*, 2019 ; Abbott *et al.*, 2021).

L'un des principaux défis associés aux approches de détection d'ADNe est de récupérer et de détecter adéquatement le matériel génétique présent dans l'environnement. Les facteurs influençant la détectabilité de l'ADN dans une matrice environnementale, de composition variable, sont encore peu étudiés à ce jour (Sakata *et al.*, 2020). Certains facteurs limitent la récupération de l'ADNe. Par exemple, la granulométrie ainsi que certains paramètres physico-chimiques (p. ex. composition ionique) influencent la capacité des sédiments à adsorber l'ADN ce qui affecte également leur capacité de désorption (Levy-Booth *et al.*, 2007 ; Torti *et al.*, 2015 ; Geraldini *et al.*, 2020). D'autres facteurs sont connus pour inhiber la réaction enzymatique au cœur de toutes les méthodes actuelles de détection d'ADNe (Schrader *et al.*, 2012, Abbott *et al.*, 2021). Cette réaction enzymatique nommée réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est utilisée pour amplifier l'ADN de l'espèce ou des espèces d'intérêt dans un échantillon. Les principaux inhibiteurs connus de la PCR sont les substances humiques (Matheson *et al.*, 2010 ; Sidstedt *et al.*, 2020), certains ions métalliques tels que le calcium et le cuivre (Combs *et al.*, 2015 ; Kuffel *et al.*, 2021) ainsi que certains composés phénoliques tels que les acides tanniques (Lance et Guan, 2020). Ces substances sont susceptibles d'être co-extraites et co-purifiées avec l'ADN. Ce faisant, elles peuvent affecter l'efficacité de la PCR, diminuant ainsi la capacité de détection de l'ADNe (Schrader *et al.*, 2012 ; Stoeckle *et al.*, 2017). La présence de ces facteurs limitant la détection d'ADNe peut affecter la production de résultats robustes et fiables, notamment en ce qui concerne la détection hâtive d'espèces envahissantes (Abbott *et al.*, 2021).

À ce jour, aucune étude n'a caractérisé l'influence des substances humiques et des ions métalliques présents dans une matrice sédimentaire sur la capacité de détection de l'ADNe. Des études précédentes ont montré que ces composés inhibent la PCR (Matheson *et al.*, 2010 ; Turner *et al.*, 2015 ; Lance et Guan, 2020 ; Kuffel *et al.*, 2021). Ces études ont soulevé l'hypothèse que ces substances, généralement présentes en plus grandes quantités dans les sédiments, tendent à limiter les détections d'ADNe dans les échantillons d'eau notamment via la resuspension des sédiments par l'action des vagues et du vent.

Ce mémoire de maîtrise présente les résultats d'un projet de recherche portant sur la caractérisation de facteurs limitant la détection d'ADNe dans les sédiments marins. La détection d'ADNe à partir d'une matrice sédimentaire s'avère intéressante considérant la teneur en matériel génétique plus élevée pour les sédiments que pour la colonne d'eau. Cette différence s'explique entre autres par des processus de sédimentation et d'adsorption ayant pour effets l'accumulation et potentiellement la réduction de la dégradation du matériel génétique au sein de cette matrice (Turner *et al.*, 2015 ; Sakata *et al.*, 2020).

Les sections suivantes de l'introduction générale ont pour but d'aborder des thèmes qui permettront au lecteur une bonne compréhension du sujet. Les thèmes suivants seront abordés : 1. l'ADN environnemental dans les sédiments marins, 2. la détection d'ADNe par PCR, 3. les facteurs limitant la détection d'ADNe et 4. les objectifs de la recherche.

1. ADN ENVIRONNEMENTAL DANS LES SÉDIMENTS MARINS

1.1 ADN environnemental (ADNe)

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est un acide nucléique composé de bases azotées, de groupements phosphates et d'un sucre, le désoxyribose (Reece et Campbell, 2012). L'ADN se présente généralement sous la forme d'une double hélice dont les deux brins sont liés entre eux par des ponts hydrogènes. Sur un même brin, les désoxyribonucléotides (bases azotées et désoxyriboses) sont joints par des liaisons phosphodiester formant un squelette désoxyribose-phosphate (Figure 1). L'arrangement des bases azotées forme une séquence de nucléotides (base azotée, désoxyribose et groupement phosphate) qui varie et définit l'information utilisée pour la synthèse de nouvelles molécules d'ADN et la synthèse de protéines.

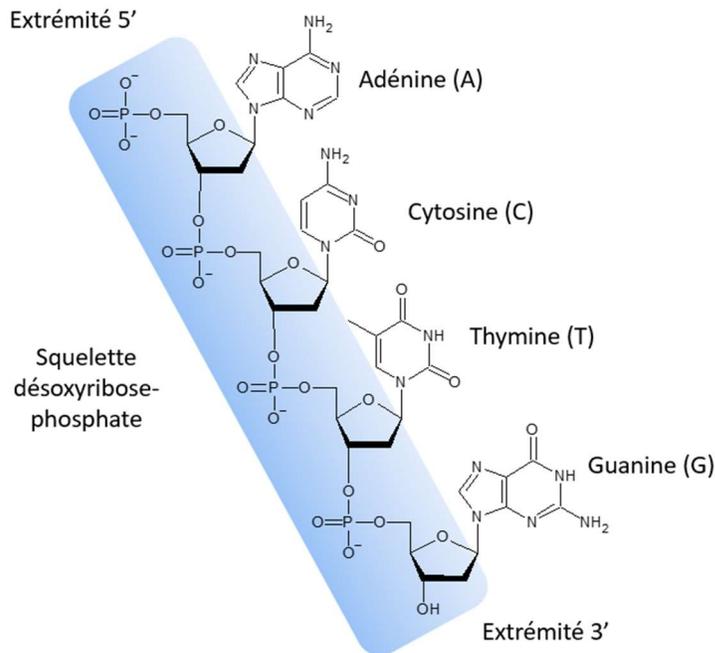


Figure 1. Représentation d'un brin d'ADN composé des quatre désoxyribonucléotides.

Le génome des espèces eucaryotes est formé d'une ou plusieurs séquences d'ADN. Deux types de génomes existent au sein d'une cellule soit le génome nucléaire retrouvé dans le noyau et le génome mitochondrial retrouvé au sein des mitochondries. Une cellule contient plusieurs mitochondries et, ce faisant, plusieurs copies du génome mitochondrial alors qu'elle ne contient qu'un seul noyau soit qu'une copie du génome nucléaire (Chial et Craig, 2008). Certaines séquences du génome sont codantes pour des protéines et forment un gène c'est-à-dire l'unité de base de l'hérédité (Black, 1996 ; Reece et Campbell, 2012). L'étude de certains de ces gènes a notamment permis de distinguer les espèces entre elles. C'est le cas du gène mitochondrial cytochrome c oxydase 1 (CO1) qui permet la distinction d'espèces en se basant sur la diversité interspécifique (Hebert *et al.*, 2003). De grandes initiatives internationales ont été mises sur pied dans le but de développer des banques de références de séquences d'ADN pour l'identification d'espèces (p. ex. BOLDSYSTEMS (<https://www.boldsystems.org/>), Fish Barcode of Life (www.fishbol.org)) (Ivanova *et al.*, 2007).

L'ADNe désigne le matériel génétique collecté dans l'environnement notamment dans des échantillons d'eau, d'air, de sols et de sédiments (Pawłowski *et al.*, 2020 ; Abbott *et al.*, 2021 ; Bruce *et al.*, 2021). Les biofilms, les contenus stomacaux et les matières fécales sont également considérés des matrices à partir desquelles l'ADN peut être extrait (Baillie *et al.*, 2019 ; Abbott *et al.*, 2021 ; De Brauwer *et al.*, 2022a). Le matériel génétique dans l'environnement peut être retrouvé sous deux formes soit libre (p. ex. molécules d'ADN libérées de mucus, de gamètes, d'urine et de fèces) ou à l'intérieur de cellules (p. ex. microorganismes) (Baillie *et al.*, 2019).

La production d'ADNe dépend de l'espèce, qui en interagissant avec le milieu dans lequel elle se trouve, libère du matériel génétique (Thomsen et Willerslev, 2015 ; Sales *et al.*, 2019 ; Pawłowski *et al.*, 2020 ; Abbott *et al.*, 2021). Cette production de matériel génétique varie, d'une part, en fonction de facteurs biotiques notamment selon le nombre et l'état des individus, soit leur stade de vie, leurs comportements, leur taille ainsi que leur statut reproducteur (Baillie *et al.*, 2019 ; Pawłowski *et al.*, 2020 ; Abbott *et al.*, 2021). D'autre part, l'excrétion d'ADNe peut aussi varier selon des facteurs abiotiques comme la modification des paramètres physico-chimiques d'un milieu causée par les profils saisonniers (Baillie *et al.*, 2019 ; Abbott *et al.*, 2021). Par exemple, une température plus élevée tend à augmenter le taux d'excrétion d'ADN d'un organisme aquatique ce qui améliore les probabilités de détection d'ADNe (Lacoursière-Roussel, 2016). Le taux d'excrétion d'ADNe peut également être plus élevé chez les espèces couvertes de mucus (p. ex. bivalves), lorsque la densité d'espèces est plus élevée ainsi que pour les individus subissant un stress (Abbott *et al.*, 2021).

Une fois libéré dans l'environnement, le matériel génétique est préservé pendant un temps dépendamment de la matrice dans lequel il se trouve et de l'influence de facteurs physiques (p. ex. température, courants, vagues, sédimentation), chimiques (p. ex. pH, adsorption, désorption, composition ionique, UV) et biologiques (p. ex. activité microbienne) (Thomsen et Willerslev, 2015 ; Turner *et al.*, 2015 ; Zulkefli *et al.*, 2019 ; Pawłowski *et al.*, 2020, Abbott *et al.*, 2021 ; Bruce *et al.*, 2021). La persistance de l'ADN dans l'environnement est plus élevée dans une matrice sédimentaire que dans la colonne d'eau (Baillie *et al.*, 2019 ;

Geraldi *et al.*, 2020 ; Pawlowski *et al.*, 2020). La durée de préservation dans ces matrices est sujette à différents intervalles de temps qu'il s'agisse du milieu dulcicole lentique, lotique ou du milieu marin (Collins *et al.*, 2018 ; Pawlowski *et al.*, 2020).

Les avantages des approches de détection d'ADNe, présentés dans les pages précédentes, comparativement aux méthodes plus traditionnelles utilisées par les programmes de surveillance expliquent l'intérêt grandissant porté à l'égard de l'ADNe (Turner *et al.*, 2015 ; Baillie *et al.*, 2019 ; Tsuji *et al.*, 2019 ; De Bauwer *et al.*, 2022a). Cet intérêt mène, encore à l'heure actuelle, au développement de méthodes pour répondre à différents besoins telle la surveillance d'espèces aquatiques entraînant, par conséquent, un plus grand nombre de publications (Tsuji *et al.*, 2019, Loeza-Quintana *et al.*, 2020). Cette hausse est attribuée entre autres à la publication de Ficetola *et al.* parue en 2008 qui constitue une véritable preuve de concept quant à l'utilisation de l'ADNe pour la détection d'une espèce envahissante (Ficetola *et al.*, 2008 ; Tsuji *et al.*, 2019, Loeza-Quintana *et al.*, 2020).

1.2 Intérêt des sédiments marins

Le potentiel de préservation du matériel génétique des sédiments leur confère un intérêt pour la détection d'ADN environnemental (Geraldi *et al.*, 2020 ; Kuwae *et al.*, 2020). Cette capacité à conserver l'ADN s'explique entre autres par l'adsorption des désoxyribonucléases (DNAses) et des molécules d'ADNe sur la matrice sédimentaire (Thomsen et Willerslev, 2015, Turner *et al.*, 2015, Sakata *et al.*, 2020). Les DNAses sont des enzymes responsables de la dégradation de l'ADN, elles hydrolysent les liaisons covalentes de type phosphodiester entraînant la fragmentation d'une séquence de nucléotides (Nielsen *et al.*, 2007 ; Varela-Ramirez *et al.*, 2017). L'activité de ces enzymes est réduite lorsqu'elles se lient à la matrice sédimentaire ce qui réduit le taux de dégradation de l'ADN (Nielsen *et al.*, 2007 ; Kuwae *et al.*, 2020).

L'adsorption des molécules d'ADNe sur les sédiments dépend des propriétés de ces derniers notamment du type de sédiment (p. ex. argile, limon, sable), mais aussi des propriétés chimiques telles que le pH et leur composition en matière organique (Pietramellara *et al.*, 2009). Les sédiments anoxiques, c'est-à-dire exempts d'oxygène, permettraient de favoriser la préservation à long terme du matériel génétique (Thomsen et Willerslev, 2015). Sakata et collaborateurs (2020) ont identifié la plus grande persistance de l'ADNe dans une matrice sédimentaire par rapport à la colonne d'eau. Plus spécifiquement, ils ont comparé le taux de dégradation du matériel génétique de deux espèces de poissons dans les sédiments de surface d'un bassin par rapport à celui de la colonne d'eau en analysant les échantillons sur une échelle de temps allant de 12 heures à 28 jours. Les propriétés des sédiments favorisant la préservation du matériel génétique font en sorte que la concentration en ADN des sédiments est supérieure à celle retrouvée dans la colonne d'eau (Turner *et al.*, 2015 ; Sakata *et al.*, 2020). La forte teneur en matériel génétique dans les sédiments marins permet de les désigner à titre de plus grand réservoir d'ADN (Thomsen et Willerslev, 2015). Les molécules d'ADN libérées dans la colonne d'eau ne restent pas en suspension (Turner *et al.*, 2015 ; Sakata *et al.*, 2020). Elles sont notamment soumises à des mouvements par les courants et forment des agrégats de particules en flocculant avec la matière qui l'entoure pour ensuite rejoindre les profondeurs (Turner *et al.*, 2015). L'une des principales sources d'ADN environnemental excrétées sur une base régulière, soit les fèces, a tendance à être plus dense et donc, à se retrouver plus rapidement en profondeur (Turner *et al.*, 2015).

L'utilisation de sédiments pourrait être particulièrement intéressante pour les détections d'ADNe d'espèces benthiques (Turner *et al.*, 2015). Toutefois, la matrice sédimentaire contient davantage d'inhibiteurs, c'est-à-dire de composés pouvant réduire la détection de l'ADN, que la colonne d'eau (Thomsen et Willerslev, 2015 ; Pawlowski *et al.*, 2021). Les prélèvements d'eau peuvent contenir des particules sédimentaires pour diverses raisons comme les conditions météorologiques (p. ex. fortes pluies) et les courants entraînant leur resuspension et leur transport (Thomsen et Willerslev, 2015). La présence de particules sédimentaires dans la colonne d'eau peut entraîner le relargage de molécules d'ADN

d'espèces n'étant plus présentes dans le milieu et ainsi fausser les interprétations qui se rapportent à la présence récente d'espèces au sein d'un échantillon (Abbott *et al.*, 2021).

1.3 Méthodes d'extraction d'ADNe

L'ADN environnemental contenu dans une matrice sédimentaire peut être isolé de différentes façons, p. ex. par extraction au phénol/chloroforme/isopropanol suivie d'une séparation de phase et d'une précipitation ainsi que par une extraction aux sels suivie d'une purification sur phase solide (colonne de silice) (Figure 2) (Pawlowski *et al.*, 2020 ; Shu *et al.*, 2020 ; Abbott *et al.*, 2021).

Au cours des dernières décennies, plusieurs trousse commerciales d'extraction d'ADN ont été développées (p. ex. QIAGEN, E.Z.N.A., ZymoBiotics, Macherey-Nagel, etc.) pour améliorer l'extraction d'acides nucléiques en étant plus simple, en minimisant le temps nécessaire, les coûts ainsi que les risques associés à cette procédure (Tsuji *et al.*, 2019 ; Pawlowski *et al.*, 2020 ; Pearman *et al.*, 2020). Ces trousse commerciales, dont la composition des réactifs n'est pas entièrement divulguée, possèdent généralement une ou des étapes de retraits d'inhibiteurs pouvant s'avérer pertinentes lors du traitement de matrices environnementales complexes (Pearman *et al.*, 2020). Selon Pawlowski *et al.* (2020), la popularité des trousse commerciales peut être expliquée par la comparaison entre les études qui permettent leur utilisation (standardisation), mais également en raison de leur facilité d'utilisation permettant le traitement d'un grand nombre d'échantillons. Cependant, les méthodes d'extraction d'ADN ne faisant pas l'objet d'une trousse commerciale d'extraction ont l'avantage de pouvoir être ajustées en fonction des propriétés et de la composition de la matrice (Lever *et al.*, 2015).

De manière générale, l'extraction d'ADN est composée de trois étapes : la lyse, la purification et la précipitation ou l'élution. La lyse peut être chimique et enzymatique, physique et mécanique ou alors une combinaison des deux (Lever *et al.*, 2015 ; Torti *et al.*, 2015). Une lyse chimique correspond à l'ajout de surfactants, d'enzymes et/ou d'agent complexifiant dans le but de lyser les cellules et de retirer les inhibiteurs dans un échantillon (Lever *et al.*, 2015). Le rôle des surfactants, notamment du bromure de cétrimonium (CTAB)

et du dodécylsulfate de sodium (SDS), est de briser les membranes cellulaires. La protéinase K est une enzyme couramment retrouvée dans les trousseaux commerciaux d'extraction d'ADN, son rôle est de détruire les protéines (Lever *et al.*, 2015 ; QIAGEN, 2020). D'autres réactifs peuvent être utilisés pour dénaturer les protéines comme le phénol et le chlorure de guanidinium (sels), ainsi que le SDS (Lever *et al.*, 2015). La lyse chimique/enzymatique peut être combinée à la lyse mécanique/physique pour optimiser l'efficacité de l'extraction d'ADN. Ainsi, la composition chimique et enzymatique des réactifs de la lyse des cellules peut être couplée à un chauffage, à une congélation à -80 °C ou à une homogénéisation (Lever *et al.*, 2015).

La seconde étape, la purification, peut être réalisée par l'ajout d'une solution de chloroforme et d'alcool isoamylique lors d'une extraction par séparation de phase (phénol-chloroforme) afin d'optimiser le retrait des impuretés comme les protéines, les lipides et les traces de réactifs. Dans les trousseaux commerciaux, l'échantillon contenant le matériel génétique libéré suite à la lyse est généralement passé sur une colonne de silice dont le but est de retenir de l'ADN. Ensuite, deux solutions à base d'éthanol et de sels permettent d'éliminer les impuretés et d'ainsi purifier le matériel génétique retenu sur la colonne (QIAGEN, 2020).

La troisième et dernière étape est dépendante de la méthode d'extraction utilisée pour isoler le matériel génétique. Dans les procédures non commerciales faisant intervenir une séparation de phase au phénol-chloroforme, la dernière étape est généralement la précipitation de l'ADN. L'ADN précipite via l'ajout d'une solution composée d'éthanol et de chlorure de sodium. L'évaporation de l'éthanol permet alors l'obtention d'un précipité de matériel génétique qui peut être dissout dans l'eau ou une solution de tris-acide chlorhydrique (Tris-HCl). De nos jours, les procédures non commerciales sont de moins en moins répandues comparativement aux trousseaux commerciaux pour obtenir du matériel génétique de qualité. Retenu dans une colonne de silice, l'ADN extrait et purifié à partir de trousseaux commerciaux est élué, soit remis en solution, par l'ajout d'un volume d'éluant (p. ex. eau stérile de grade moléculaire ou solution Tris-HCl).

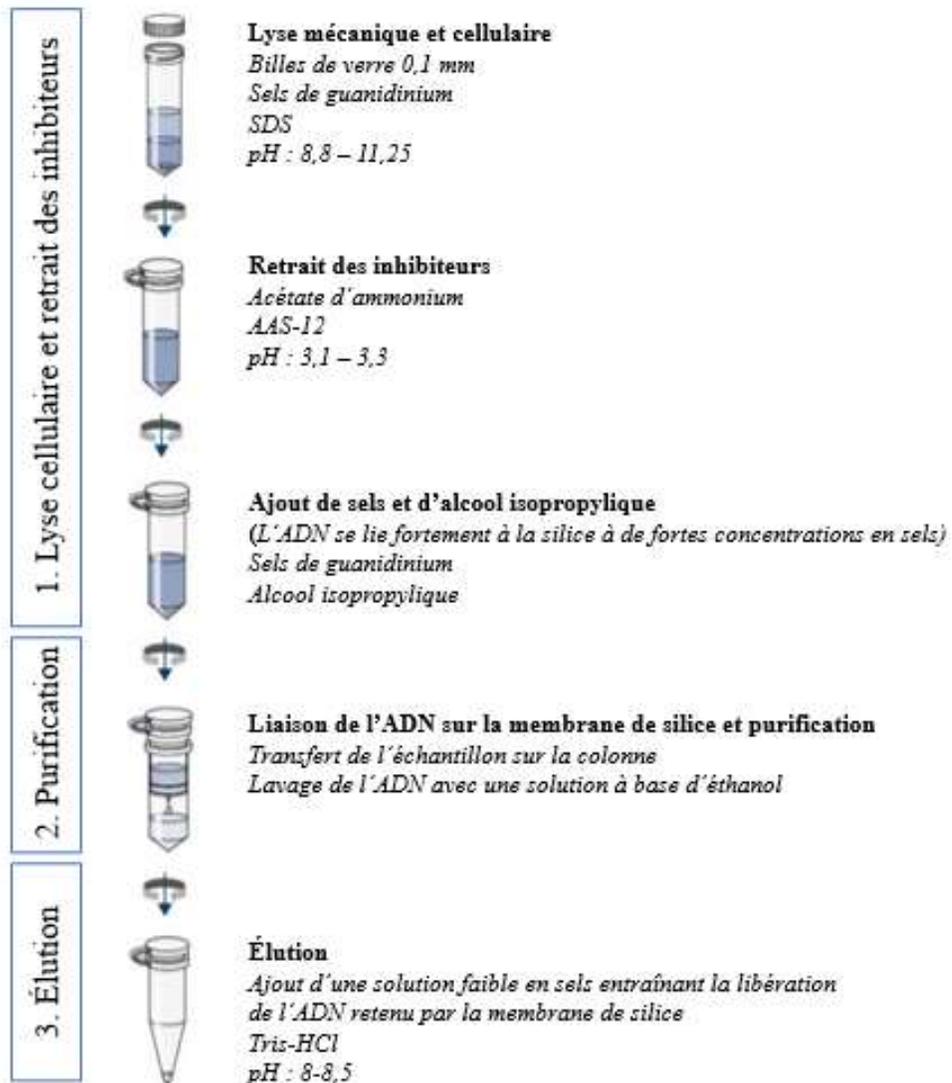


Figure 2. Exemple d'une procédure d'extraction d'ADN de la compagnie QIAGEN pour la trousse DNeasy® PowerSoil DNA Extraction. (Adaptée de QIAGEN, 2020)

2. DÉTECTION D'ADNE PAR PCR

La détection par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est la réaction enzymatique utilisée pour l'amplification et la détection d'ADNe que ce soit en métagénomique (metabarcoding) ou PCR quantitative (qPCR) (Deiner *et al.*, 2018 ; Roux *et al.*, 2020 ; Abbott *et al.*, 2021). Récemment, d'autres approches incluant cette réaction telle que la PCR digitale (dPCR) et la PCR digitale par microgouttelettes (ddPCR) ont été développées afin d'accroître la sensibilité de détection de l'ADN (Harper *et al.*, 2019 ; Abbott *et al.*, 2021).

2.1 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Proposée pour la première fois dans les années 70 et développée par Kary Mullis en 1983, la réaction de polymérisation en chaîne consiste à amplifier un segment d'ADN au moyen d'une enzyme : la polymérase (Kleppe *et al.*, 1971 ; Mullis *et al.*, 1986 ; Sambrook et Russel, 2001 ; Griffiths *et al.*, 2010). Les principales composantes nécessaires au fonctionnement de la réaction sont présentées au tableau 1, telles que décrites dans les ouvrages de référence Sambrook et Russel (2001) et Griffiths *et al.* (2010). Certaines composantes optionnelles, n'étant pas présentées, peuvent également être ajoutées.

Certaines des composantes principales peuvent être retrouvées au sein d'une même solution prête à l'emploi nommée « PCR Master Mix » (ThermoFisher Scientific, s.d. a ; MilliporeSigma, 2013). Cette solution contient généralement la polymérase, des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs), du chlorure de magnésium ($MgCl_2$) à titre de cations divalents (p. ex. Mg^{2+}) et un tampon pour maintenir le pH (ThermoFisher Scientific, s.d. a ; MilliporeSigma, 2013). Les amorces et la matrice d'ADN à amplifier doivent être ajoutées à un volume de « Master Mix » préalablement à la PCR (ThermoFisher Scientific, s.d. a).

Tableau 1. Principales composantes d'une PCR.

Composantes	Définitions
Polymérase	Enzyme utilisée pour catalyser la réaction d'élongation d'un segment d'ADN.
Amorces	Segments de nucléotides de 15 à 20 paires de bases (pb) spécifiques aux extrémités d'une séquence d'ADN dont l'amplification est visée.
Désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs)	Matière première pour l'amplification, soit les désoxyribonucléotides (bases azotées et désoxyriboses) en quantité équimolaire qui serviront à synthétiser les nouveaux segments d'ADN : Désoxyadénosine triphosphate (dATP); Désoxythymidine triphosphate (dTTP); Désoxyguanosine triphosphate (dGTP); Désoxycytidine triphosphate (dCTP).
Cations divalents	En solution, généralement du magnésium (Mg^{2+}), dont la présence est nécessaire au fonctionnement de la polymérase.
Cations monovalents	En solution, généralement du chlorure de potassium (KCl), dont l'augmentation de la concentration améliore l'efficacité d'amplification de segments d'ADN plus court.
Tampon pH	Tampon utilisé pour maintenir le pH à une valeur entre 8,3 et 8,8 à température pièce. Par exemple : Tris-Cl.
ADN	Matrice ou extrait d'ADN simple ou double brin.

Références : Sambrook et Russel, 2001 ; Griffiths *et al.*, 2010.

La PCR se déroule lorsque toutes les composantes sont réunies dans un appareil de type thermocycleur ; effectuant des cycles de température. La réaction est composée de trois étapes : la dénaturation, l'appariement des amorces et l'élongation (Figure 3) (Sambrook et Russel, 2001 ; Griffiths *et al.*, 2010).

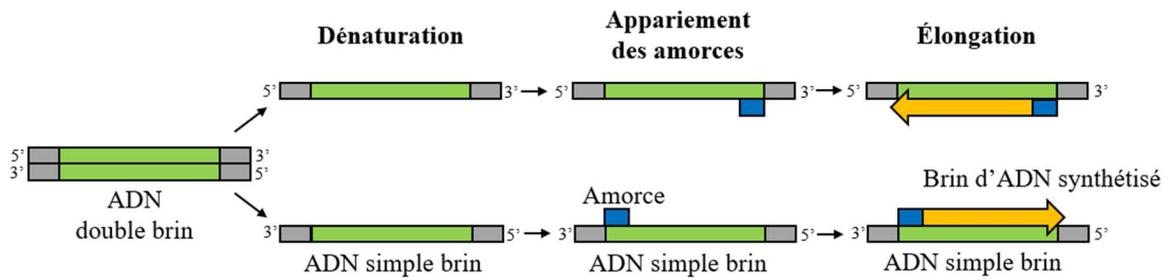


Figure 3. Étapes d'une PCR (Inspirée de ThermoFisher Scientific, s.d. b)

La dénaturation consiste en la séparation de l'ADN double brin en ADN simple brin. Cette étape s'effectue à une température fixe déterminée selon le contenu en cytosine et en guanine du segment d'ADN. Puisque ces nucléotides forment des liaisons triples entre elles, la température nécessaire au bris de ces liaisons est plus élevée que pour la liaison double entre l'adénine et la thymine (Figure 4) (Sambrook et Russel, 2001). La température à laquelle se produit la dénaturation est habituellement supérieure à 90 °C (Sambrook et Russel, 2001).

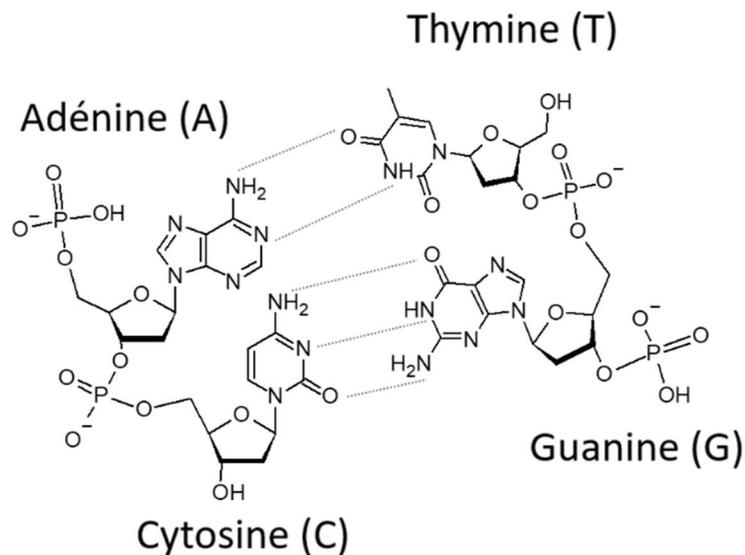


Figure 4. Complémentarité des acides nucléiques

La seconde étape consiste en l'appariement de la paire d'amorces sur les simples brins d'ADN résultant de la dénaturation. La température est un facteur déterminant dans l'appariement des amorces (Helbing et Hobbs, 2019). Si elle est trop basse, la résultante peut être un appariement d'amorces non spécifique au gène ciblé alors que si elle est trop élevée, l'appariement des amorces au gène ciblé est peu probable (Sambrook et Russel, 2001).

L'élongation est la dernière étape d'un cycle de PCR. Elle consiste à la synthèse de l'ADN par la polymérase en utilisant les dNTPs en solution. De ce fait, la température du thermocycleur doit permettre à l'enzyme d'être dans des conditions optimales pour assurer l'efficacité de la réplication (Sambrook et Russel, 2001 ; Griffiths *et al.*, 2010). Le taux de polymérisation de la Taq polymérase est d'approximativement 2 000 nucléotides par minute (Sambrook et Russel, 2001).

Ces trois étapes sont répétées sous forme de cycle, synthétisant de manière exponentielle de nouveaux segments d'ADN (Figure 3). Le nombre de cycles de PCR se situe généralement entre 30 et 50 dépendant du nombre de copies du segment d'ADN dans la matrice initiale et de l'épuisement d'une composante de la réaction, plus spécifiquement des dNTPs. Le magnésium, soit le cation divalent le plus utilisé dans les réactions PCR, doit être présent en concentration suffisante dans la réaction pour favoriser l'activité de l'enzyme tout en se liant avec les dNTPs (Sambrook et Russel, 2001). De ce fait, la concentration d'ions magnésium disponibles pour l'activité de la polymérase peut diminuer s'il se trouve en présence d'un chélatant, le plus commun étant l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), ou en présence d'ions chargés négativement (Sambrook et Russel, 2001).

Bien qu'il existe un nombre théorique de cycles d'amplification pour amplifier une seule molécule d'ADN présente dans une réaction de PCR, ce nombre théorique n'est pas nécessairement observé en ce qui concerne la détection d'ADNe. En effet, la détection d'ADNe peut être sujette à la présence d'inhibiteurs pouvant retarder l'amplification du faible nombre de molécules d'ADN présent et ainsi mener à l'absence de détection (présenté dans la section 3).

Aussi, la PCR n'est généralement pas recommandée pour la détection d'ADNe puisque des méthodes plus sensibles ont été développées comme la qPCR permettant la quantification de l'amplification via la fluorescence émise lors de la réaction alors que la PCR ne peut être que semi-quantitative (Helbing et Hobbs, 2019). Le produit de l'amplification par PCR est analysé par électrophorèse à l'aide d'un agent intercalant (p. ex., bromure d'éthidium, GelRed ©) dont la révélation aux UV permet de déterminer l'intensité lumineuse alors que l'emplacement de la bande peut être comparé à une échelle de poids moléculaire.

2.2 PCR quantitative (qPCR)

La PCR quantitative (qPCR) est une analyse permettant la quantification d'acides nucléiques de façon sensible en plus d'être spécifique (Arya *et al.*, 2005 ; Bustin *et al.*, 2009). À ce jour, il s'agit de la principale méthode de détection utilisée pour identifier un segment d'ADN spécifique dans un échantillon environnemental (Abbott *et al.*, 2021). Elle consiste en la détection et à la mesure par fluorescence des produits générés dans les cycles de réaction en chaîne par polymérase (PCR) (Arya *et al.*, 2005 ; Bustin *et al.*, 2009 ; Harper *et al.*, 2019). Dans la qPCR, les composantes sont les mêmes que pour une PCR classique (p. ex. amorces, polymérase, dNTPs, etc.) à l'exception de l'ajout d'agents fluorescents. En effet, la qPCR permet la quantification du matériel génétique par l'utilisation d'intercalants (SYBR® Green) ou de sonde d'hydrolyse (TaqMan) (Arya *et al.*, 2005 ; Harper *et al.*, 2019 ; Bio-Rad, 2020 ; Abbott *et al.*, 2021).

2.2.1 Agent intercalant

Un intercalant est un agent fluorescent non spécifique qui s'insère dans l'ADN double brin lors de la synthèse de nouveaux segments d'ADN pendant l'étape d'élongation (Arya *et al.*, 2005 ; Abbott *et al.*, 2021). Les molécules intercalées dans les brins d'ADN émettent une fluorescence alors que les molécules qui ne se sont pas liées n'ont qu'une très faible émission permettant ainsi de suivre la fluorescence à chaque cycle d'amplification (Arya *et al.*, 2005).

2.2.2 Sonde d'hydrolyse

L'utilisation d'une sonde d'hydrolyse permet d'augmenter la spécificité de la détection puisque la sonde, comme les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN, doit également

s'apparier sur la séquence d'ADN ciblée (Arya *et al.*, 2005 ; Bio-Rad, 2020). La région ciblée par la sonde doit se trouver entre les deux amorces. En ce sens, la fluorescence mesurée est proportionnelle aux séquences d'ADN produites lors de l'amplification (Arya *et al.*, 2005 ; Abbott *et al.*, 2021). Plus spécifiquement, la sonde d'hydrolyse permet de quantifier par fluorescence, à chaque cycle d'amplification, la concentration d'ADN dans la réaction.

La sonde consiste en une séquence d'environ 20 à 30 nucléotides spécifiques au segment d'ADN à amplifier comportant, à chacune de ces extrémités, un fluorophore (Arya *et al.*, 2005 ; Helbing et Hobbs, 2019). Le fluorophore de l'extrémité 5' est en mesure d'absorber le signal et d'agir à titre de rapporteur en termes de fluorescence détectée (Arya *et al.*, 2005 ; Bio-Rad, 2020). Lorsque la sonde est en solution et non-appariée à l'ADN, le fluorophore 5' absorbe un signal envoyé par l'instrument, les électrons sont excités et, lorsqu'ils retournent à leur état stable, cela libère de l'énergie qui est transmise le long de la sonde pour atteindre l'extrémité 3'. Le fluorophore de l'extrémité 3' est appelé en anglais « quencher molecule » (molécule d'extinction), il empêche la détection d'un signal par l'instrument par l'absorption de l'énergie relâchée par les électrons puisque la sonde est intacte (Arya *et al.*, 2005 ; Bio-Rad, 2020). Lorsque la sonde est appariée au brin d'ADN complémentaire à sa séquence, l'activité exonucléase de 5' vers 3' de la polymérase entraîne la dégradation de la sonde au cours de la réaction PCR (Holland *et al.*, 1991). À chaque cycle d'amplification, la sonde est hydrolysée par l'activité de la polymérase ce qui entraîne la libération du fluorophore d'intérêt (5') dans le milieu réactionnel (Arya *et al.*, 2005 ; Bio-Rad, 2020). Le fluorophore 5' n'étant plus lié à la molécule d'extinction (fluorophore de l'extrémité 3'), l'énergie relâchée n'est plus absorbée, elle génère alors un signal fluorescent qui est capté par l'appareil (Bio-Rad, 2020). La fluorescence augmente de manière exponentielle avec la production d'ADN double brin, la dégradation de sondes et la libération de fluorophores, jusqu'à l'obtention d'un plateau expliqué soit par une diminution des réactifs présents en solution ou par une diminution de l'efficacité de la polymérase (Arya *et al.*, 2005 ; Bio-Rad, 2020 ; Abbott *et al.*, 2021).

Il existe des sondes d'hydrolyse de type TaqManTM MGB où MGB est l'acronyme de « minor groove binder ». Pour ces sondes, l'extrémité 3' est pourvue d'une molécule d'extinction non-fluorescente (quencher non fluorescent : NFQ), mais aussi composée d'un liant (MGB) ce qui augmente la température de fusion de la sonde (Arya *et al.*, 2005 ; ThermoFisher Scientific, 2020). L'ajout du liant MGB à l'extrémité 3' fait en sorte que la séquence d'oligonucléotides que comporte la sonde peut être plus courte (12-17 nucléotides) sans diminuer la stabilité de l'appariement lors de l'amplification (Mackay, 2004). De plus, le couplage NFQ-MGB s'avère plus sensible et précis en raison de la diminution du bruit de fond qu'il entraîne (Mackay, 2004 ; ThermoFisher Scientific, 2020).

2.2.3 Détection

La détection de la fluorescence générée par la production de nouveaux produits d'amplification est rendue possible par l'utilisation d'un thermocycleur composé d'une source d'excitation et d'un système de détection de fluorescence (Navarro *et al.*, 2015). La fluorescence peut être représentée par une courbe d'amplification où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles d'amplification réalisé (Figure 5).

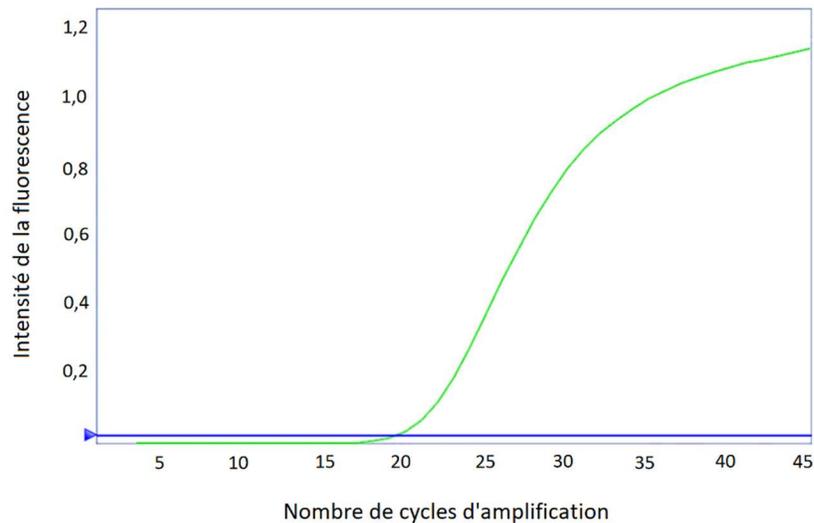


Figure 5. Exemple de courbe d'amplification générée par PCR quantitative. Le tracé vert correspond à l'intensité de fluorescence détectée en fonction du nombre de cycle d'amplification alors que la ligne horizontale bleue correspond à la valeur seuil arbitraire de fluorescence) (Réalisé avec le logiciel Agilent Aria 1.71 d'Agilent Technologies).

Lorsque l'ADN ciblé est amplifié au-delà d'un seuil arbitraire, sa détection est mesurée par l'intensité de la fluorescence relative à la génération de produits à chaque cycle d'amplification (Abbott *et al.*, 2021). Un seuil arbitraire de fluorescence est généralement déterminé automatiquement par l'appareil pour une lecture d'une plaque de qPCR. Il peut être ajusté systématiquement à une valeur identifiée par l'utilisateur ou déterminé par un algorithme par l'appareil. Cependant, il doit se retrouver dans la zone exponentielle d'amplification en étant suffisamment élevé pour être supérieur au bruit de fond sans toutefois atteindre le plateau engendré par l'épuisement de l'enzyme ou l'insuffisance de réactifs (Bio-Rad, 2020). L'endroit sur l'axe des abscisses où la courbe d'amplification d'un échantillon donné traverse le seuil arbitraire est appelé le cycle de quantification (Cq). Le cycle de quantification correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaire afin que la fluorescence détectée croise le seuil de fluorescence arbitraire établi (Bio-Rad, 2020 ; Abbott *et al.*, 2021).

Une valeur de Cq plus grande pour un échantillon par rapport à un autre indique une plus faible quantité d'ADN initialement, puisque plus de cycles d'amplification ont été nécessaires pour atteindre le même seuil de fluorescence fixé (Abbott *et al.*, 2021). Ainsi, les Cq peuvent être utilisés pour comparer des échantillons.

Une quantification absolue de l'ADN ciblé présent dans un échantillon peut être réalisée en comparant le Cq à une droite d'étalonnage (Abbott *et al.*, 2021). La réalisation d'une droite d'étalonnage permet de déterminer la limite de détection (LD) d'un test pour une espèce ciblée. La LD peut être établie statistiquement en fonction de la variance entre les réplicats de chaque point de la droite d'étalonnage (Klymus *et al.*, 2019). Selon Abbott *et al.* (2021), la LD d'un test qPCR correspond à la « 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) ». Cette définition est retrouvée dans divers articles scientifiques (Bustin *et al.*, 2009 ; Klymus *et al.*, 2019). Deux méthodes ont été identifiées par Klymus *et al.* (2019) pour déterminer la LD soit la méthode des seuils discrets et la méthode d'ajustement de courbe modélisée (Klymus *et al.*, 2019 ; Abbott *et al.*, 2021).

Récemment, Lesperance *et al.* (2021) ont développé une méthode faisant intervenir un modèle de type binomial (réaction positive-négative) et une distribution de Poisson des molécules pour lequel les limites de détection pour plusieurs essais sont plus faibles que celles établies par Klymus *et al.* (2019).

2.3 Réplicats

Un réplicat est, par définition, un échantillon répété que ce soit lors de l'échantillonnage (réplicats de terrain) ou pendant les diverses étapes de traitement en laboratoire (p. ex. réplicats techniques : de filtration, d'extraction, de qPCR) (Abbott *et al.*, 2021). La réplication permet de prendre connaissance et de réduire l'erreur entre les résultats selon les variations décelées entre les réplicats. Le taux de réplication nécessaire varie entre les études dépendamment des objectifs ciblés dans le but d'obtenir des résultats fiables et robustes (Ficetola *et al.*, 2014). Il est primordial de rapporter les résultats de la réplication de manière transparente afin d'améliorer les détections d'ADNe.

Deux réplicats techniques sont plus couramment identifiés pour les manipulations en laboratoire soit le réplicat d'extraction et le réplicat de qPCR. Le réplicat d'extraction est généralement peu utilisé lorsqu'une forte réplication est réalisée sur le terrain. Cependant, cette réplication peut permettre de confirmer la validité d'un résultat s'il semble suspect, et elle est généralement utilisée lors d'optimisation de processus d'extraction ou d'étude pilote pour laquelle aucun échantillonnage n'est réalisé. En ce qui concerne la réplication de la détection par qPCR, il s'agit de l'analyse répétée d'un même extrait d'ADN (Abbott *et al.*, 2021). L'augmentation du nombre de réplicats est directement liée à la capacité de détection d'ADN (Klymus *et al.*, 2019). L'utilisation d'un nombre de réplicats élevés peut entraîner la diminution de la LD et augmenter la probabilité de détection de l'ADN en faible concentration, et ce, en assurant une meilleure fiabilité des résultats (Klymus *et al.*, 2019 ; Abbott *et al.*, 2021 ; Lesperance *et al.*, 2021).

3. FACTEURS LIMITANT LES DÉTECTIONS D'ADNE

La détection d'ADNe peut être entravée ou rendue impossible via l'action de différents facteurs à plusieurs étapes du traitement (Lance et Guan, 2020 ; Burian *et al.*, 2021). L'un des principaux défis analytiques en ADNe consiste en la détection de matériel génétique d'intérêt présent en faible concentration. Cette problématique est notamment pertinente pour la détection d'espèces aquatiques envahissantes et d'espèces en péril, et ce, dans une matrice environnementale complexe (Hunter *et al.*, 2019 ; Loeza-Quintana *et al.*, 2020 ; Sidsted *et al.*, 2020 ; Burian *et al.*, 2021). Ces approches font intervenir des échantillons de matrices variées qu'ils s'agissent d'eau, de sédiments de surface ou de profondeur, de sol, d'air ou de contenus stomacaux dont la composition peut réduire les capacités de détection de matériel génétique (Matheson *et al.*, 2010 ; Schrader *et al.*, 2012 ; Sutlovic *et al.*, 2015 ; Bruce *et al.*, 2021).

3.1 Granulométrie et composition minérale d'une matrice sédimentaire

La granulométrie est identifiée comme un facteur pouvant limiter la capacité de détection d'ADNe dans des échantillons de sédiments et également dans les échantillons d'eau lorsqu'il est question de matières en suspension (Buxton *et al.*, 2017 ; He *et al.*, 2020). Ce paramètre peut être exprimé selon les classes de Wentworth (1922), des plus grandes aux plus petites particules : gravier, sable, limon et argile. Une identification plus précise à une sous-catégorie comme sable très grossier, grossier, moyen, fin et très fin est aussi possible. Le tableau 2 présente les classifications de Wentworth exprimées selon la taille des particules en millimètres tels que présenté dans le *Guide de caractérisation physico-chimique et toxicologique des sédiments* du Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques et Environnement et Changement Climatique Canada (2016). Dans les sédiments, l'ADN aurait tendance à se lier davantage à l'argile puisque sa capacité d'adsorption serait cent fois plus grande que celle du sable alors que celle du limon se retrouverait entre les deux (Torti *et al.*, 2015 ; Buxton *et al.*, 2017).

Tableau 2. Classification de la taille de particules

Taille (mm)	Classe Wentworth
> 16	Gravier très grossier
≤ 16 et > 8	Gravier grossier
≤ 8 et > 4	Gravier fin
≤ 4 et > 2	Gravier très fin
≤ 2 et > 1	Sable très grossier
≤ 1 et > 0,5	Sable grossier
≤ 0,5 et > 0,25	Sable moyen
≤ 0,25 et > 0,125	Sable fin
≤ 0,125 et > 0,0625	Sable très fin
≤ 0,0625 et > 0,031	Limon grossier
≤ 0,031 et > 0,0156	Limon moyen
≤ 0,0156 et > 0,008	Limon fin
≤ 0,008 et > 0,004	Limon très fin
≤ 0,004	Argile

Source : Adapté de MDELCC et ECC, 2016

Selon Levy-Booth (2007), la différence de capacité d'adsorption de l'ADN sur les différentes particules sédimentaires pourrait être expliquée par leur surface de contact et leur densité de charge qui dépendent de la composition minéralogique. La composition minéralogique est complémentaire à la granulométrie sur la capacité de détection de l'ADN puisque la composition minérale des sédiments, comme la proportion de Montmorillonite et Kaolinite (minéraux retrouvés dans l'argile), permet de mieux caractériser la capacité d'adsorption d'ADN de la matrice (Levy-Booth *et al.*, 2007).

3.2 Inhibiteurs

L'inhibition est un problème fréquemment rencontré lors des analyses en ADNe dans des matrices provenant d'environnements variés (Lance et Guan, 2020 ; Loeza-Quintana *et al.*, 2020). Abbott *et al.* (2021) définit les inhibiteurs comme des « substances non ciblées dans l'environnement (p. ex. solides en suspension, ions métalliques) qui demeurent présentes dans l'échantillon au moment du prélèvement et pendant l'extraction d'ADN. ». Ces substances sont connues pour réduire la détectabilité de l'ADN en qPCR (Schrader *et al.*, 2012 ; Lance et Guan, 2020).

Dans les relevés d'ADNe, la présence inconnue d'inhibiteurs pourrait avoir des conséquences négatives sur la détection et par conséquent, sur la prise de décision liée à un programme de surveillance environnementale (Lance et Guan, 2020). Plus spécifiquement, la présence d'inhibiteurs peut mener à la modification de la sensibilité d'un test en qPCR et à l'obtention de faux-négatifs (Schrader *et al.*, 2012 ; Sutlovic *et al.*, 2015 ; Beng *et al.*, 2020). La sensibilité d'une analyse en qPCR est définie selon le document intitulé *Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments* (MIQE Guidelines) comme étant le nombre de copies minimal qu'il est possible de détecter précisément dans un échantillon (Bustin *et al.*, 2009). En ADNe, la sensibilité est définie selon Abbott *et al.* (2021) comme étant la « capacité d'un test qPCR de détecter la cible prévue [...] de détecter un vrai positif ». Les modèles qui définissent la relation entre la présence et l'abondance des organismes en fonction des probabilités de détection en ADNe basées sur le nombre de copies détectées en qPCR sont aussi soumis à l'incertitude causée par la présence potentielle d'inhibiteurs (Lance et Guan, 2020).

Un faux négatif est l'absence de la détection de l'ADN d'une espèce ciblée alors que cette dernière est bien présente dans le milieu échantillonné (Uchii *et al.*, 2019 ; Loeza-Quintana *et al.*, 2020). Les faux négatifs peuvent résulter de la présence d'inhibiteurs interférant avec l'enzyme responsable de l'amplification, les réactifs ou même, la séquence d'ADN (PCR detection of microbial pathogens, 2013 ; Combs *et al.*, 2015). Selon Sutlovic *et al.* (2015) et Uchii *et al.* (2019), la vérification de la présence potentielle d'inhibiteurs est nécessaire pour conclure que le matériel génétique ciblé n'est pas présent et pour produire des résultats robustes en qPCR pour l'ADNe.

3.2.1 Identifier la présence d'inhibiteurs

La présence d'inhibiteurs dans les échantillons environnementaux marins peut être dépendante de la matrice, des sites d'échantillonnage et de leur salinité ainsi que des saisons (Matheson *et al.*, 2010 ; Schrader *et al.*, 2012 ; Uchii *et al.*, 2019 ; Loeza-Quintana *et al.*, 2020). Une végétation abondante entraînant une plus grande proportion de composés organiques ainsi que la contamination anthropique sont des facteurs qui peuvent entraîner

une accumulation d'inhibiteurs (Uchii *et al.*, 2019). Cette variabilité entraîne des défis en ce qui concerne le traitement adéquat des échantillons environnementaux (Loeza-Quintana *et al.*, 2020). De plus, la composition chimique des échantillons prélevés pour l'analyse d'ADNe est rarement caractérisée ce qui fait que la présence d'inhibiteurs n'est pas identifiée préalablement aux traitements des échantillons (Lance et Guan, 2020). L'identification de la présence d'inhibiteurs peut permettre la mise en place de mesures pour réduire, voire éliminer l'inhibition ou alors servir à valider l'absence de l'ADN ciblé dans un échantillon (Lance et Guan, 2020 ; Loeza-Quitana *et al.*, 2020 ; Burian *et al.*, 2021).

Diverses méthodes sont utilisées pour identifier la présence d'inhibiteurs telles que l'utilisation d'un contrôle positif interne (CPI), l'analyse de l'efficacité et de la cinétique d'amplification ainsi que la dilution de l'échantillon (PCR detection of microbial pathogens, 2013 ; Sidsted *et al.*, 2020). Elles seront présentées dans les sections suivantes.

Ajout d'un contrôle positif interne (CPI)

La méthode la plus répandue dans la littérature pour identifier la présence d'inhibiteurs consiste en l'ajout d'un contrôle positif interne (CPI) (Combs *et al.*, 2015 ; Goldberg *et al.*, 2016 ; Harper *et al.*, 2019 ; Lance et Guan, 2020 ; Abbott *et al.*, 2021). Ce contrôle prend la forme d'un ajout en quantité connue d'une séquence d'ADN exogène dans l'ensemble des échantillons (Roux *et al.*, 2020 ; Loeza-Quintana *et al.*, 2020). Pour les analyses en ADNe, la quantité de matériel génétique exogène ajoutée comme CPI doit être représentative des faibles concentrations retrouvées dans des échantillons environnementaux de manière à refléter le degré d'inhibition pouvant affecter les échantillons (Goldberg *et al.*, 2016 ; Lance et Guan ; 2020). La détection du CPI peut être retardée ou complètement inhibée en présence d'inhibiteurs (Lance et Guan, 2020 ; Loeza-Quintana *et al.*, 2020). Plus spécifiquement, une différence de nombre de cycles d'amplification (ΔCq) en ce qui concerne la détection du CPI dans un échantillon environnemental (Cq CPI éch.) en comparaison au CPI dans un témoin négatif (eau stérile de grade moléculaire ; Cq CPI témoin) peut permettre d'identifier l'inhibition (Goldberg *et al.*, 2016 ; Lance et Guan, 2020 ; Loeza-Quintana *et al.*, 2020).

Selon les auteurs, une différence de trois cycles d'amplification entre le CPI dans un échantillon environnemental par rapport à un témoin négatif confirme la présence d'inhibiteurs (Goldberg *et al.*, 2016), tandis que d'autres identifient une différence d'un cycle comme étant suffisante pour attester de la présence d'inhibiteurs (Buxton *et al.*, 2017).

Analyse de l'efficacité et de la cinétique d'amplification

Les CPI précédemment décrits peuvent être utilisés pour déterminer l'efficacité d'amplification à partir de la pente d'une courbe d'étalonnage analysée en qPCR (PCR Detections of Microbial Pathogens, 2013). Une variation de plus de 10 % de l'efficacité d'amplification qu'il s'agisse d'une augmentation ou d'une diminution indique la présence potentielle d'inhibiteurs (Abbott *et al.*, 2021). L'étude de la cinétique d'amplification via l'analyse des courbes d'amplification pourrait permettre d'identifier la présence d'inhibiteurs (PCR Detections of Microbial Pathogens, 2013 ; Sidsted *et al.*, 2020). En effet, une courbe d'amplification affectée par la présence d'inhibiteurs possède un tracé moins exponentiel qu'un échantillon non influencé par la présence d'inhibiteurs (voir figure 5).

Dilution de l'échantillon

La dilution des extraits préalablement à la détection est une méthode utilisée pour identifier la présence d'inhibiteurs en plus de permettre de réduire voire d'éliminer leurs effets (Schrader *et al.*, 2012 ; Hunter *et al.*, 2019 ; Loeza-Quintana *et al.*, 2020 ; Kuffel *et al.*, 2021). Cette méthode peut être réalisée par la réduction du volume d'extrait ajouté dans la solution de PCR (Harper *et al.*, 2019). Bien que l'utilisation de cette méthode soit répandue, de nombreux auteurs critiquent son utilisation puisqu'une dilution de l'extrait pour réduire la concentration en inhibiteurs entraîne inévitablement une dilution du matériel génétique (Matheson *et al.*, 2010 ; Goldberg *et al.*, 2016 ; Burian *et al.*, 2021 ; Kuffel *et al.*, 2021). Cette dilution peut réduire la concentration de matériel génétique sous la limite de détection et ainsi causer un faux négatif (Goldberg *et al.*, 2016 ; Harper *et al.*, 2019 ; Pawlowski *et al.*, 2021).

3.2.2 Mécanismes d'action des inhibiteurs

L'effet d'un inhibiteur dépend de son mécanisme d'action sur la détection du matériel génétique, mais également de sa concentration (Schrader *et al.*, 2012 ; Kuffel *et al.*, 2021). Différents mécanismes ont été identifiés dans plusieurs champs d'application soit en microbiologie, en science médico-légale et en analyse environnementale (PCR detection of microbial pathogens; 2013; Lance et Guan, 2020 ; Kuffel *et al.*, 2021). Les inhibiteurs sont généralement catégorisés en trois classes dans la littérature selon leur interaction avec le matériel génétique, les réactifs de lyse et les composantes d'une analyse en qPCR (Schrader *et al.*, 2012 ; PCR detection of microbial pathogens, 2013 ; Sutlovic *et al.*, 2015 ; Beng *et al.*, 2020 ; Kuffel *et al.*, 2021). Ces principaux mécanismes d'action sont abordés dans les sections suivantes.

Interactions avec le matériel génétique

La présence de certains facteurs affectant la préservation du matériel génétique ainsi que la présence de nucléases dans une matrice environnementale pourraient faire en sorte que l'ADN soit dégradé entraînant une diminution des probabilités de détection d'ADNe (Schrader *et al.*, 2012 ; Kuffel *et al.*, 2021). Il peut également être question d'inhibiteurs possédant la capacité d'interagir avec le matériel génétique de manière à réduire ou à rendre impossible sa détection dans un échantillon. En ce sens, l'inhibiteur peut se lier au matériel génétique ce qui peut occasionner une diminution de la capacité de récupération de l'ADN pendant la lyse notamment si cette dernière n'est pas suffisamment efficace. La liaison de l'ADN avec différents composés, dont les ions métalliques et les composés organiques, entraîne la formation de complexes de haut poids moléculaire qui tendent à réduire l'efficacité de la lyse lors de l'extraction (Matheson *et al.*, 2010 ; Combs *et al.*, 2015 ; Beng *et al.*, 2020 ; Kuffel *et al.*, 2021). Cette conséquence est liée au fait que le matériel génétique est moins disponible, voire impossible à récupérer et donc, à amplifier (Combs *et al.*, 2015 ; Uchii *et al.*, 2019 ; Kuffel *et al.*, 2021). La séquestration de l'ADN dans la matrice représente un défi de taille puisqu'elle est impossible à identifier par l'ajout d'un CPI lors de la qPCR (Combs *et al.*, 2015). En effet, l'inhibiteur n'interagirait pas avec le CPI ajouté.

Une autre interaction possible des inhibiteurs consiste à leur extraction et leur purification conjointement avec le matériel génétique entraînant des difficultés de détection lors de la PCR. L'extraction d'ADN peut entraîner l'isolation de composés connus pour avoir des effets négatifs sur la détection par PCR notamment s'ils empêchent l'appariement des amorces (Schrader *et al.*, 2012 ; Combs *et al.*, 2015 ; Sutlovic *et al.*, 2015 ; Kuffel *et al.*, 2021). Selon Kuffel *et al.* (2021), le squelette de phosphate de l'ADN, en raison de sa charge négative, pourrait avoir une affinité à se lier avec les ions métalliques de charges positives.

Interactions avec les réactifs de lyse

Il est possible que, sans être liée avec la séquence d'ADN, une substance inhibitrice se trouvant dans l'échantillon affecte la procédure d'extraction, plus spécifiquement l'étape de lyse (Kuffel *et al.*, 2021 ; Pawlowski *et al.*, 2021). Cette étape servant à briser les membranes cellulaires fait parfois intervenir une enzyme comme la protéinase K (Lever *et al.*, 2015). Les inhibiteurs peuvent interagir avec l'enzyme de manière à réduire son efficacité et donc, à réduire la libération et la récupération du matériel génétique (Kuffel *et al.*, 2021 ; Pawlowski *et al.*, 2021).

Interactions avec les réactifs de PCR

Les inhibiteurs présents dans un extrait peuvent affecter différentes étapes de l'analyse en qPCR (Schrader *et al.*, 2012 ; Beng *et al.*, 2020 ; Lance et Guan, 2020 ; Kuffel *et al.*, 2021). Leur présence peut entraîner une réduction de l'efficacité d'amplification ou une absence complète d'amplification causée par l'inactivation de la polymérase (Schrader *et al.*, 2012 ; Harper *et al.*, 2019 ; Pawlowski *et al.*, 2021). Certaines polymérases sont moins tolérantes à la présence d'inhibiteurs ce qui fait qu'elles sont rarement utilisées dans les matrices complexes comme les matrices environnementales (voir Matheson *et al.*, 2010 ; Uchii *et al.*, 2019). Par exemple, le calcium est un inhibiteur connu dont le mécanisme d'action consiste à se lier par compétition à la polymérase à la place de l'ion magnésium qui est nécessaire au fonctionnement de la PCR (Combs *et al.*, 2015 ; Kuffel *et al.*, 2021). D'autres composés comme l'EDTA ont un effet indirect sur la polymérase puisqu'ils ne l'influencent pas

directement, mais impliquent plutôt une réduction des ions magnésium nécessaire à son fonctionnement (Schrader *et al.*, 2012 ; PCR detection of microbial pathogens, 2013). Il est à noter que l'EDTA se retrouve généralement dans le tampon d'élution de trousse commerciales destinées à l'extraction de matériel génétique à partir de sang et de tissu parfois utilisée pour les analyses d'ADNe (p. ex. DNeasy® Blood and Tissue Kit de QIAGEN). Une modification du tampon d'élution peut se révéler adéquate pour réduire les risques d'inhibition de la PCR par les réactifs.

L'inhibition peut également être causée par un effet de certains composés sur la fluorescence détectée lors de la PCR quantitative (PCR detection of microbial pathogens, 2013). Les effets connus incluent une interférence avec la fluorescence émise par une sonde d'hydrolyse pendant l'amplification (p. ex. extinction de la fluorescence/fluorescence quenching) et/ou une augmentation de la fluorescence de référence passive parfois contenue dans le « Master Mix » (Schrader *et al.*, 2012 ; Hunter *et al.*, 2019 ; Sidsted *et al.*, 2020).

3.2.3 Méthodes mises en place pour réduire et éliminer l'inhibition

Diverses méthodes ont été étudiées, puis mises en place de manière à réduire et à éliminer l'inhibition. En ce qui concerne les matrices environnementales, Sidsted *et al.* (2020) suggère la réalisation d'une étude préliminaire avec des conditions de matrice similaire à celles des échantillons et en ajoutant des CPI en qPCR afin d'établir la marche à suivre pour traiter les échantillons (p. ex. ajustement de la salinité) (Sidsted *et al.*, 2020).

Optimisation de la procédure d'extraction de matériel génétique

Les inhibiteurs peuvent être associés à une matrice spécifique ou se retrouver dans plusieurs d'entre-elles ce qui explique le développement des procédures propres aux matrices étudiées (Schrader *et al.*, 2012 ; Harper *et al.*, 2019 ; Beng *et al.*, 2020). Alors que plusieurs équipes de recherche tentent d'uniformiser leurs procédures pour mieux comparer leurs résultats via l'utilisation d'une même trousse commerciale, la mise en place d'une procédure d'extraction d'ADN spécifique à la matrice et composée d'étapes liées à la purification du matériel génétique est parfois nécessaire pour assurer l'obtention d'un extrait contenant peu

d'impuretés et d'inhibiteurs (Harper *et al.*, 2019 ; Kuffel *et al.*, 2021 ; Pawlowski *et al.*, 2021). Certaines de ces procédures sont développées par des équipes de recherche visant à réduire la présence d'inhibiteurs ciblés alors que des trousse commerciales sont proposées pour différentes matrices (p. ex. DNeasy® PowerSoil pour les sédiments et DNeasy® PowerWater pour l'eau par la compagnie QIAGEN) (Pearman *et al.*, 2020 ; Kuffel *et al.*, 2021 ; Pawlowski *et al.*, 2021).

Une étape de purification supplémentaire peut être réalisée après la procédure d'extraction afin d'améliorer l'efficacité de l'amplification (Schrader *et al.*, 2012 ; Goldberg *et al.*, 2016 ; Pawlowski *et al.*, 2021). Cette purification peut notamment être ajoutée pour réduire la concentration d'inhibiteurs dans un extrait de manière à obtenir un résultat au-dessus de la limite de détection si l'ADN ciblé se retrouve dans l'échantillon (Hunter *et al.*, 2019 ; Lance et Guan, 2020). Des trousse commerciales de purification sont généralement utilisées telle la trousse de ZymoResearch OneStep Inhibitor Removal Kit (ZymoResearch, s.d. ; Goldberg *et al.*, 2016 ; Deiner *et al.*, 2018 ; Harper *et al.*, 2019). Cependant, les publications suggérant cette méthode pour réduire voire éliminer la présence d'inhibition indiquent qu'elle pourrait également occasionner une diminution de la concentration de l'ADN ciblé dans l'extrait (Goldberg *et al.*, 2016 ; Burian *et al.*, 2021).

Dilution des extraits préalablement à la détection

Lear *et al.*, (2018) et Kuffel *et al.* (2021) indiquent que cette méthode pour faire face à l'inhibition peut procurer des résultats satisfaisants en cas de concentration élevée en inhibiteur notamment en ce qui concerne les analyses environnementales. Le choix du facteur de dilution est crucial puisqu'il doit être suffisamment élevé pour permettre de réduire l'effet des inhibiteurs, mais également suffisamment faible pour ne pas entraîner une dilution trop importante du matériel génétique présent (Lance et Guan, 2020).

Optimisation des réactifs et de leur concentration dans la réaction de qPCR

Pour réduire l'influence des inhibiteurs, plusieurs publications dans les domaines de l'ADN environnemental et des sciences médico-légales suggèrent d'optimiser les réactifs et

leur concentration dans la réaction de qPCR (Goldberg *et al.*, 2016 ; Harper *et al.*, 2019 ; Lance et Guan, 2020 ; Kuffel *et al.*, 2021). Les paramètres de la PCR peuvent également être modifiés afin de permettre la détection du matériel génétique en présence d'inhibiteurs. Pawlowski *et al.* (2021) rapporte la possibilité d'augmenter le nombre de cycles d'amplification puisque l'inhibition peut entraîner un retard de détection. Toutefois, cette augmentation pourrait également avoir des effets indésirables (p. ex. faux-positif).

Parmi les méthodes d'optimisation suggérées, le choix de la polymérase, soit de l'enzyme responsable de l'amplification, est couramment identifié (Matheson *et al.*, 2010 ; Goldberg *et al.*, 2016 ; Uchii *et al.*, 2019 ; Lance et Guan, 2020 ; Sidsted *et al.*, 2020). En effet, certaines polymérases sont plus tolérantes aux inhibiteurs c'est-à-dire qu'elles conservent leur efficacité et leur sensibilité en présence de ces composés non ciblés (Goldberg *et al.*, 2016 ; Lance et Guan, 2020). Les polymérases peuvent être vendues dans des solutions prêtes à l'emploi (Master Mix) afin de réduire l'inhibition. Ces dernières sont de plus en plus employées. Par exemple, Jane *et al.* (2015) rapporte une diminution de l'inhibition permettant l'obtention de détections positives lors de l'utilisation du réactif commercial TaqMan Environmental Master Mix 2.0 de ThermoFisher Scientific comparativement à l'utilisation d'un réactif commercial non spécifique aux analyses environnementales. Ces méthodes ne requièrent pas de modification au traitement de l'échantillon ce qui les rend avantageuses bien que plus coûteuses (Matheson *et al.*, 2010 ; Jane *et al.*, 2015 ; Uchii *et al.*, 2019).

La modification des concentrations en réactifs de PCR est une méthode ayant été employée, toutefois elle de moins en moins utilisée de nos jours avec la commercialisation des « Master Mix » plus efficaces pour réduire l'influence des inhibiteurs (Uchii *et al.*, 2019 ; Lance et Guan, 2020 ; Sidsted *et al.*, 2020 ; Kuffel *et al.*, 2021). Par exemple, l'augmentation de la concentration de polymérase pourrait améliorer la capacité de détection de matériel génétique en présence d'inhibiteurs (Matheson *et al.*, 2010 ; Sidsted *et al.*, 2020). Matheson *et al.* (2010) soulève cependant que cette méthode est plus coûteuse et peut se révéler non concluante ce qui explique pourquoi l'augmentation de la concentration en polymérase n'est

pas recommandée sur une base régulière. La modification de la composition ionique et du pH peut entraîner une réduction de l'inhibition en facilitant l'amplification (PCR detection of microbial pathogens, 2013 ; Sidsted *et al.*, 2020). L'augmentation de la concentration en chlorure de magnésium peut être employée pour renverser l'inhibition causée par la présence d'ions calcium (Lance et Guan ; 2020 ; Kuffel *et al.*, 2021). En revanche, Kuffel *et al.* (2021) indique que des effets indésirables peuvent être occasionnés en raison de l'augmentation d'ions magnésium soit une diminution de la fidélité et de la spécificité de l'analyse (p. ex. appariement peu spécifique des amorces).

L'ajout d'un adjuvant dans la solution de qPCR pourrait permettre de réduire l'effet de certains inhibiteurs sur la détection du matériel génétique (Schrader et al, 2012 ; PCR detection of microbial pathogens, 2013 ; Lance et Guan, 2020 ; Sidsted *et al.*, 2020). L'albumine de sérum bovin (ASB, *BSA* en anglais) est le principal adjuvant ajouté lors de l'analyse en qPCR d'échantillons environnementaux et médico-légaux complexes (PCR detection of microbial pathogens, 2013 ; Goldberg *et al.*, 2016 ; Harper *et al.*, 2019 ; Lear *et al.*, 2018). L'ASB est une protéine de transport qui se lie efficacement à plusieurs petites molécules inhibitrices ce qui réduit leur effet d'inhibition sur la PCR, notamment en ce qui concerne les inhibiteurs dont le mécanisme d'action consiste à se lier à la polymérase (PCR detection of microbial pathogens, 2013 ; Sidsted *et al.*, 2020). Le tréhalose est aussi l'un des adjuvants dont l'utilisation est répandue pour faire face aux inhibiteurs. Il s'agit d'un soluté qui, présent dans la solution de PCR, permet d'améliorer la stabilité thermique de la polymérase selon Sidsted *et al.* (2020). L'EDTA est un chélatant reconnu pour se lier aux inhibiteurs présents dans la solution de PCR, empêchant ainsi qu'ils diminuent l'efficacité de l'amplification (Matheson *et al.*, 2010). Cependant, l'EDTA chélate également les ions magnésiums qui sont nécessaires au bon fonctionnement de la polymérase, c'est pourquoi Kuffel *et al.* (2021) fait mention de l'acide éthylène bis (oxyéthylènenitrolo) tétraacétique (EGTA) dont l'affinité est moins forte pour ces ions à titre d'adjuvant. En effet, l'EGTA est utilisé pour renverser l'effet inhibiteur causé par la présence d'ions calcium (Kuffel *et al.*, 2021).

L'effet des adjuvants dépend des inhibiteurs présents, soit de la composition des échantillons, mais également de la concentration de l'adjuvant ajouté (PCR detection of microbial pathogens, 2013 ; Lance et Guan, 2020). Cette dernière doit être suffisante pour permettre de faire face à l'inhibition, mais ne doit pas être trop élevée sans quoi l'adjuvant pourrait occasionner un effet inhibiteur (PCR detection of microbial pathogens, 2013). Les méthodes décrites précédemment ont permis de réduire l'effet inhibiteur de différents composés et de permettre une détection de matériel génétique dans des échantillons complexes (Lance et Guan, 2020). De plus, la combinaison d'adjuvants ne serait pas bénéfique pour la détection du matériel génétique, mais pourrait plutôt entraîner de l'inhibition (PCR detection of microbial pathogens, 2013).

3.2.4 Principaux inhibiteurs

Les principaux inhibiteurs connus, identifiés lors d'études portant sur les sciences médico-légales et/ou sur la détection d'ADNe, sont répertoriés à la figure 6. Ces inhibiteurs ont été identifiés lors de tests en laboratoire. Combs et collaborateurs (2015) ont ajouté une quantité connue d'ADN à des solutions de métaux (aluminium, calcium, cuivre, fer, nickel, plomb) qui a par la suite été amplifiée en qPCR pour déterminer l'effet de concentrations croissantes de métaux sur la capacité de détection de la trousse de réactifs de PCR utilisée en sciences médico-légales. Kuffel et collaborateurs (2021) ont comparé l'effet de neuf ions métalliques sur différentes polymérases par la même approche. L'inhibition causée par les acides humiques et les acides fulviques a aussi été déterminée via leur ajout en concentrations croissantes dans des solutions de qPCR préalablement à la détection de matériel génétique (Lance et Guan, 2020, aussi pour les acides phytiques et tanniques) ainsi que la résistance et l'efficacité de différents réactifs de PCR (Matheson *et al.*, 2010 ; Uchii *et al.*, 2019).

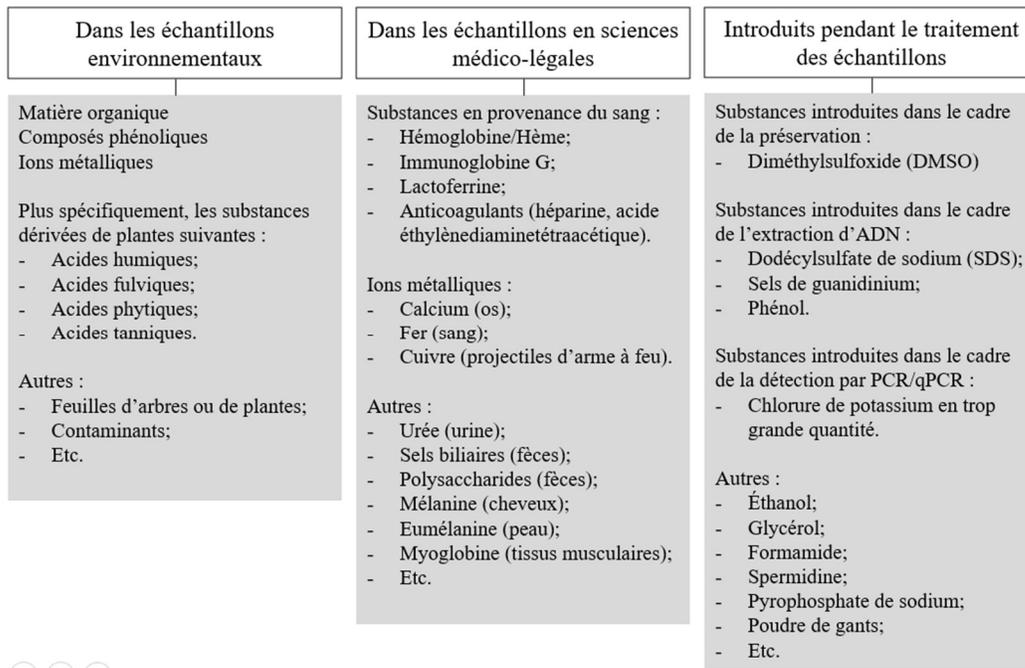


Figure 6. Résumé des principaux inhibiteurs connus à ce jour (Réalisé à partir de Matheson *et al.*, 2010 ; Schrader *et al.*, 2012 ; PCR detection of microbial pathogens, 2013 ; Combs *et al.*, 2015 ; Sutlovic *et al.*, 2015 ; Lance and Guan, 2020 ; Uchii *et al.*, 2019 ; Beng *et al.*, 2020 ; Sidsted *et al.*, 2020 ; Kuffel *et al.*, 2021 ; Pawlowski *et al.*, 2021).

Les substances humiques (acides humiques, acides fulviques et humine) représentent la plus grande proportion de la matière organique naturelle contenue dans les sols et les sédiments (52-100 %) de même que la majorité de la matière organique naturelle dissoute dans l'eau (Tremblay et Gagné, 2007 ; Tremblay & Gagné, 2009 ; American Public Health Association, 2017). Dans les sédiments marins, elles proviennent généralement de matières organiques terrestres (p. ex. lignine, tannins) et marines (p. ex. phytoplancton) (Crossey, 2003). Plus spécifiquement, les acides humiques ont été identifiés dans la littérature comme étant le principal inhibiteur des réactions d'amplification en ce qui concerne les échantillons environnementaux (Sutlovic *et al.*, 2015 ; Lance et Guan, 2020 ; Sidsted *et al.*, 2020 ; Pawlowski *et al.*, 2021). De ce fait, les matrices sédimentaires sont généralement définies comme étant plus à même de contenir des inhibiteurs notamment en raison de l'accumulation de matières organiques et de contaminants comme les ions métalliques (Sutlovic *et al.*, 2015 ; Pawlowski *et al.*, 2021).

L'approche d'ajout de composés dans la solution de PCR préalablement à la détection a permis d'identifier les inhibiteurs présentés à la figure 6 quant à leur effet sur l'étape de la détection. Toutefois, cette approche n'est pas représentative des conditions auxquelles est soumis un échantillon réel considérant l'absence de l'étape d'extraction du matériel génétique comme le mentionne Kuffel et collaborateurs (2021). Des tests supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre et évaluer l'effet de ces composés au sein d'une matrice environnementale préalablement à l'étape d'extraction du matériel génétique et de la qPCR.

4. OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'objectif principal de ce projet de recherche est de caractériser l'effet de facteurs tels que la granulométrie des sédiments, la concentration d'acides humiques et d'ions métalliques pouvant limiter la détection d'ADN environnemental dans les sédiments marins. Nous avons utilisé une approche contrôlée afin de caractériser l'influence de ces facteurs sur la capacité à détecter l'ADNe dans les sédiments. Ces facteurs sont modulés ou ajoutés à une matrice sédimentaire traitée chimiquement pour retirer les acides humiques, les ions métalliques, et certains composés phénoliques. Le protocole utilisé pour la préparation de cette matrice est présenté dans le chapitre 1. Le chapitre 2 présentera un article scientifique et les résultats des trois objectifs suivants.

4.1 Objectif 1

Le premier objectif est de caractériser l'effet de la granulométrie d'une matrice sédimentaire sur la détectabilité de l'ADN environnemental. L'effet de la taille des particules sédimentaires inférieures à deux millimètres, plus spécifiquement l'effet de la proportion en limon et en sable sur la détectabilité de l'ADNe, est étudié dans le cadre de ce projet. De plus, la composition minéralogique des différents sédiments caractérisés pour leur granulométrie a également été analysée pour mieux comprendre son effet sur la détectabilité de l'ADN dans les sédiments marins.

4.2 Objectif 2

Le deuxième objectif est de caractériser l'effet de la présence d'acides humiques sur la détectabilité de l'ADN environnemental dans une matrice sédimentaire. Le présent projet de recherche vise à étudier l'effet de l'ajout en concentration croissante d'acides humiques sur la détectabilité de l'ADN tout en étant représentatif des procédures utilisées pour le traitement d'un échantillon environnemental dans l'analyse de la détection d'ADNe.

4.3 Objectif 3

Le troisième objectif est de caractériser l'effet de la présence d'ions métalliques sur la détectabilité de l'ADN environnemental. Pour ce faire, quatre ions métalliques qui se retrouvent naturellement et par l'action d'activités anthropiques dans les sédiments marins ont été ciblés soit le calcium, le fer, le cuivre et le manganèse (Millero, 2002 ; Murnyak *et al.*, 2009 ; Gledhiir et Buck, 2012 ; Pinsino *et al.*, 2012).

CHAPITRE 1

TRAITEMENT DE SÉDIMENTS MARINS PAR EXTRACTIONS CHIMIQUES CIBLÉES

1.1 RÉSUMÉ

Une matrice sédimentaire est traitée chimiquement afin de retirer les principaux inhibiteurs connus que sont les acides humiques, les ions métalliques ainsi que certains composés phénoliques. La méthodologie mise en place vise à effectuer trois extractions ciblées séquentiellement de manière à obtenir une matrice relativement exempte d'inhibiteurs que la procédure d'extraction d'ADN pourrait co-isoler. L'extraction des métaux labiles est effectuée selon la méthode de minéralisation à chaud à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M. Les acides humiques et les acides fulviques sont ensuite extraits via des extractions acido-basiques. Les composés phénoliques et autres composés organiques peu polaires sont aussi retirés de la matrice sédimentaire par une extraction au Soxhlet utilisant du dichlorométhane. Ces traitements chimiques impliquent une dégradation de l'ADN présent dans les sédiments.

1.2 MISE EN CONTEXTE

De plus en plus de publications soulignent la présence de facteurs inhibiteurs comme la principale source de faux négatifs dans les études en ADNe (Jane *et al.*, 2015 ; Goldberg *et al.*, 2016 ; Buxton *et al.*, 2017 ; Harper *et al.*, 2019 ; Uchii *et al.*, 2019 ; Loeza-Quintana *et al.*, 2020 ; Burian *et al.*, 2021 ; Thalinger *et al.*, 2021). Pour cette raison, l'utilisation des contrôles positifs internes se répand jusqu'à devenir indispensable pour assurer la fiabilité et la juste interprétation des données (Furlan et Gleeson, 2016 ; Goldberg *et al.*, 2016 ; Abbott *et al.*, 2021 ; Pawlowski *et al.*, 2021 ; De Brauwer *et al.*, 2022b).

Toutefois, rares sont les études qui s'attardent à étudier ce qui est présent dans l'environnement et qui pourrait influencer les détections d'ADNe. En effet, la composition

des matrices environnementales est faiblement voire non-caractérisée pour identifier les facteurs limitant la détectabilité de l'ADN (Lance et Guan, 2020). La plupart des études dont l'objectif était d'évaluer les effets de composés chimiques tels les substances dérivées des plantes (p. ex. acides humiques, acides fulviques, acides tanniques) et les ions métalliques (p. ex. calcium, fer) se sont intéressées sur l'effet de ces composés à l'étape de la PCR (Matheson *et al.*, 2010 ; Lance et Guan, 2020 ; Kuffel *et al.*, 2021). Certaines de ces études, notamment Kuffel et collaborateurs (2021), ont soulevé que les tests effectués directement dans la solution de PCR n'étaient pas représentatifs des conditions de traitement auxquelles un échantillon réel est soumis.

Plus spécifiquement pour les sédiments, quelques études se sont intéressées à comprendre les interactions entre l'ADN et les composantes d'une matrice sédimentaire. Kanbar et collaborateurs (2020) ont investigué l'interaction entre le matériel génétique par rapport à la composition minérale et la composition en matière organique d'une matrice sédimentaire en provenance d'un lac en spectroscopie infrarouge. Plus récemment, Nkuna *et al.* (2022) ont étudié l'effet d'ajout d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) à des résidus miniers dans le but d'améliorer les capacités de détection de matériel génétique en présence d'ions métalliques.

Bien que ces études soient d'intérêt pour mieux comprendre l'impact de différents facteurs limitant la détection d'ADNe, aucun facteur ne peut être identifié précisément. Il s'agit plutôt d'un ensemble de facteurs qui semble expliquer la détectabilité du matériel génétique dans l'environnement. Ce faisant, il est important de comprendre l'effet de facteurs individuellement, puis de combinaisons de facteurs, en les ajoutant dans une matrice sédimentaire traitée pour être relativement exempte des principaux composés connus pour limiter les détections d'ADNe. Ces principaux inhibiteurs sont à même de se retrouver naturellement dans les échantillons prélevés de matrices environnementales. Il s'agit de la matière organique, plus spécifiquement des substances humiques, ainsi que des ions métalliques et des composés phénoliques. Compte tenu du fait que ces composés influencent les résultats et les interprétations qui découlent de l'analyse du matériel génétique dans

l'environnement, ils devraient être éliminés par des extractions chimiques ciblées afin de pouvoir étudier leur effet dans une matrice sédimentaire. Les méthodes les plus communes pour extraire ces composés ont été utilisées pour traiter chimiquement la matrice sédimentaire alors qu'il n'existe, à ce jour, aucun matériau de référence certifié en ADNe.

Substances humiques

Les caractéristiques des substances humiques qui permettent notamment de distinguer les acides humiques des acides fulviques et de l'humine permettent également leur isolation. En effet, les substances humiques sont catégorisées en trois groupes en fonction de leur solubilité relative soit les acides humiques, les acides fulviques et l'humine (Tremblay, 2003 ; American Public Health Association, 2017). Les acides humiques sont notamment solubles à des pH supérieurs à deux, alors que les acides fulviques sont solubles sur une large gamme de pH. L'humine reste insoluble au sein de la matrice minérale, et ce, indépendamment du pH (Crossey, 2003 ; Tremblay, 2003 ; Tremblay et Gagné, 2009).

La société internationale des substances humiques (IHSS) propose l'utilisation de la méthode publiée par Swift (1996) faisant intervenir de l'acide chlorhydrique, de l'hydroxyde de sodium, de l'hydroxyde de potassium, du chlorure de potassium, de l'acide fluorhydrique ainsi qu'une résine XAD-8 (IHSS, 2022). Cette procédure est réalisée sur du matériel sédimentaire ou en provenance de sols préalablement séché et tamisé (2 mm). Des extractions acides et basiques sont réalisées et puis les différentes fractions récoltées sont purifiées pour quantifier et qualifier la composition en substances humiques, plus spécifiquement en acides humiques et en acides fulviques. La figure 7 présente le protocole simplifié d'extraction des substances humiques sédimentaires marines mis en place par Tremblay (2003) d'après la méthode de Swift (1996).

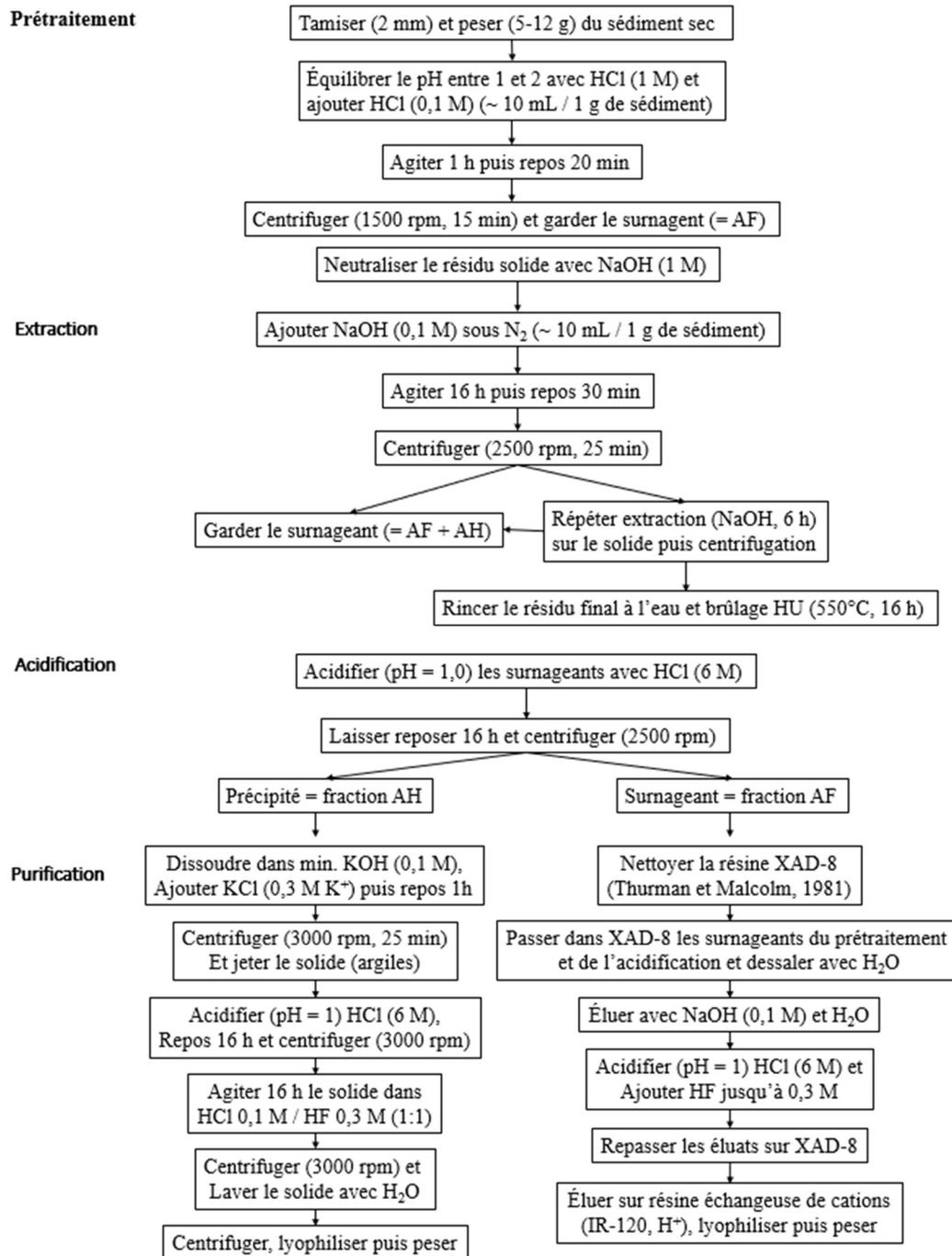


Figure 7. Protocole d'extraction des substances humiques sédimentaires (d'après Swift, 1996) repris de Tremblay (2003).

Ions métalliques

Les ions métalliques se retrouvent dans les sédiments marins où ils sont entre autres entraînés via la floculation et l'accumulation des particules de la colonne d'eau vers les profondeurs (Aminot et Chaussepieds, 1983). Ils peuvent notamment former des complexes avec la matière organique et être adsorbés à la matrice sédimentaire. Le traitement en laboratoire visant à extraire et à analyser les métaux dans les solides dépend entre autres de la fraction visée par le traitement qu'il s'agisse de métaux disponibles pour l'environnement (métal extractible total) ou des métaux faiblement liés ou très faiblement liés à la matrice (métal extractible avec HCl 1 M) (Aminot et Chaussepieds, 1983 ; CEAEQ, 2012).

En ce qui concerne l'extraction des métaux très faiblement liés aux sédiments, soit les métaux qui pourraient être libérés lors de la procédure d'extraction d'ADN, la méthode couramment employée consiste à l'ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M à la matrice sédimentaire, puis à l'agitation du mélange. Par centrifugation, il est ensuite possible de prélever le surnageant dans lequel se retrouve les métaux ayant été désorbés pour en faire l'analyse. Il est primordial que le temps d'extraction (temps d'agitation) soit suffisant pour permettre la désorption complète de la fraction visée (Snape *et al.*, 2004 ; CEAEQ, 2012).

Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des inhibiteurs de la réaction de qPCR naturellement présent dans l'environnement et donc, potentiellement présents dans les échantillons d'ADNe (Wilson, 1997 ; Farrel et Gladys, 2012 ; Kumar *et al.*, 2020). Ils proviennent entre autres des plantes (p. ex. des feuilles et des racines) et ils se présentent sous différentes formes en fonction du nombre de cycles phénoliques qu'ils contiennent ainsi que des constituants auxquels ils sont liés (Barba *et al.*, 2014). Plusieurs méthodes ont été mises sur pied pour extraire ces composés, notamment la percolation, la macération, l'infusion et l'extraction au Soxhlet. D'autres méthodes comme l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction

assistée par ultrasons et l'extraction au dioxyde de carbone supercritique ont également été employées pour extraire les composés phénoliques de diverses matrices (Alara *et al.*, 2021).

Plus spécifiquement pour les sédiments, Goldberg et Weiner (1980) ont extrait ces composés via l'extraction au Soxhlet. Cette technique d'extraction est couramment utilisée en ce qui concerne l'isolation de différents composés à partir d'une matrice naturelle solide comme le sol et les sédiments. Elle consiste à l'insertion de la matrice solide dans une cartouche de cellulose qui est positionnée au sein du montage d'extraction au Soxhlet dans lequel un solvant polaire est amené à ébullition puis condensé sous l'effet d'un réfrigérant (Alara *et al.*, 2021). Au cours d'un cycle, le solvant est amené à passer au travers de la matrice sédimentaire et permet l'extraction des composés phénoliques. Plusieurs cycles peuvent être réalisés pour obtenir un rendement optimal d'extraction. Le solvant utilisé doit être polaire. On note l'utilisation de dichlorométhane, d'éthanol, d'acétone et d'hexane dans la littérature qui concerne l'extraction des composés phénoliques par cette méthode (Goldberg et Weiner, 1980 ; Alara *et al.*, 2021).

1.3 OBJECTIF

Dans le contexte du présent projet, l'utilisation d'une matrice sédimentaire traitée et caractérisée était souhaitée pour la mise en place d'une approche contrôlée visant à évaluer l'influence de facteurs tels que la granulométrie, la présence ainsi que la concentration d'ions métalliques et d'acides humiques. L'objectif de ce chapitre est d'établir les lignes directrices et la méthodologie concernant les extractions chimiques ciblées ayant été réalisées pour traiter les sédiments préalablement à leur réhydratation et à leur utilisation.

1.4 MÉTHODOLOGIE

La méthodologie concernant le traitement chimique des sédiments se base d'une part sur les propriétés des composés à retirer de la matrice et, d'autre part, sur les caractéristiques de la procédure d'extraction employée pour isoler le matériel génétique. Considérant le fait que la procédure d'extraction fait intervenir différents gradients de pH et de salinité pour

lyser et récupérer le matériel génétique, la procédure visant à traiter chimiquement les sédiments doit tenir compte des inhibiteurs qui pourraient être co-isolés de la matrice sédimentaire lors de cette étape. Lors de la lyse, le pH est basique ce qui tend à solubiliser les acides humiques alors que pour le retrait des inhibiteurs, le pH est plutôt acide, ce qui entraînerait la désorption des ions métalliques labiles.

La méthodologie mise en place vise à effectuer trois traitements successivement, en combinant certaines étapes des procédures d'extractions spécifiques à l'isolation des ions métalliques labiles, des acides humiques et fulviques ainsi que des composés phénoliques, de manière à obtenir une matrice relativement exempte d'inhibiteurs que la procédure d'extraction d'ADN pourrait tendre à co-isoler. La procédure d'extractions chimiques ciblées utilisées pour traiter les sédiments est présentée à la figure 9 (voir également l'Annexe I pour plus de détails).

Échantillonnage de sédiments

Une sortie d'échantillonnage de sédiments a eu lieu le 11 mai 2021 au Parc national du Bic (Qc). La facilité d'accès et les réglementations mises en place pour les parcs nationaux qui visent à préserver la faune et la flore expliquent le choix du lieu d'échantillonnage. Ces réglementations ont aussi permis de supposer que les sédiments prélevés n'étaient pas ou alors que très peu affectés par les activités anthropiques. Deux sites ont été échantillonnés soit l'Anse à Wilson et la Baie des Cochons identifiés sur la carte présentée à la figure 8. La différence de taille des particules fut le critère de sélection des deux sites afin d'obtenir des matrices sédimentaires dont la granulométrie était suffisamment différente pour la réalisation de l'objectif 1 (Effet de la granulométrie sur la détectabilité de l'ADN). Le site de l'Anse à Wilson avait une matrice sédimentaire visuellement composée de sable alors que les sédiments du site de la Baie des Cochons semblaient composés de sable et de particules plus fines (limon) ce qui fut confirmé par une analyse de la granulométrie dont les résultats sont présentés dans le Chapitre 2.

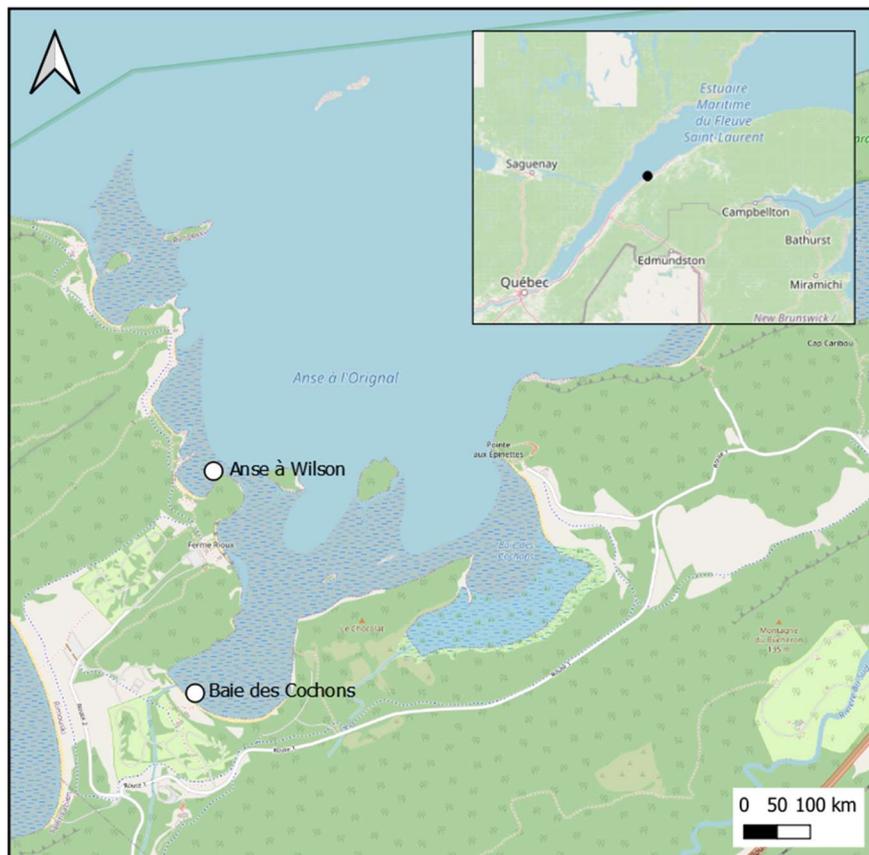


Figure 8. Carte du Parc national du Bic présentant les deux sites d'échantillonnages (Réalisée avec QGIS 3.18).

Les sédiments de surface ont été prélevés à marée basse à l'aide de seringues de 140 mL modifiées. Cette procédure décrite dans Pawlowski *et al.* (2021) permet de conserver l'intégrité de la matrice sédimentaire et de conserver uniquement les premiers millimètres de sédiments.

Prétraitement de la matrice sédimentaire

Les sédiments naturels ont d'abord été tamisés humides sur un tamis composé d'un filet en nylon soutenu par un cadre de bois pour récupérer les particules dont la taille n'excédait pas 2 mm de diamètre (exclure le gravier, les roches, les racines). Les sédiments ont ensuite été séchés à l'étuve (ThermoFisher Lindberg/Blue M Gravity Oven) à 105 °C

pendant un minimum de 30 heures pour évaporer l'eau. Par la suite, ils ont été fractionnés en sous-échantillons de trois grammes dans des tubes Falcon de 50 mL préalablement nettoyés à l'acide chlorhydrique 10 %.

Extractions des ions métalliques labiles

La méthode visant l'extraction des ions métalliques très faiblement liés à la matrice sédimentaire proposée par le CEAEQ (2012) et par Snape *et al.* (2004) a été utilisée. Ainsi, une solution d'acide chlorhydrique 1 M a été ajoutée aux sédiments (ratio 10 mL HCl 1 M/1 g de sédiments sec), le mélange a été agité constamment au Wrist-Action-Shaker pendant 24 heures puis centrifugé à 5000 rotations par minutes (rpm) pendant dix minutes. Le surnageant, contenant les métaux labiles s'étant désorbés, a été retiré à l'aide d'une pipette de verre et la procédure d'extractions chimiques ciblées a été poursuivie à partir de la matrice sédimentaire. La composition en ions métalliques labiles du surnageant a été analysée en spectrométrie d'émission atomique à plasma micro-onde (MP-AES) afin de valider le retrait des composés ciblés par l'objectif 2 visant à étudier l'effet de l'ajout des ions calcium, cuivre, fer et manganèse sur la détectabilité de l'ADN. Les résultats sont répertoriés au tableau 5 de l'annexe II pour consultation.

Extraction des acides humiques et fulviques

L'extraction des acides humiques et des acides fulviques a été réalisée sur la matrice sédimentaire résultante de l'extraction des ions métalliques labiles via une procédure adaptée de la méthode suggérée par l'IHSS (Swift, 1996) et reprise par Tremblay (2003). Considérant que la première étape de l'extraction des acides humiques et fulviques proposée par cette procédure (Prétraitement, voir figure 7) fait intervenir une extraction en solution acide et que l'extraction des ions métalliques labiles a été effectuée à plus forte concentration d'acide, cette étape n'a pas été réalisée. Ainsi, une grande fraction des acides fulviques a été retirée avec les métaux labiles.

Le pH de la matrice sédimentaire suite à l'extraction des ions métalliques labiles a été ajusté à 7 à l'aide d'une solution de NaOH 1 M. Puis, une solution de NaOH 0,1 M a été ajoutée en conservant le ratio de 10 mL de réactif d'extraction par gramme de sédiments (Swift, 1996). À cette étape, les manipulations n'ont pas été réalisées sous atmosphère inerte ce qui constitue une modification à la procédure puisque la finalité visée n'était pas la caractérisation et/ou la quantification des acides humiques et des acides fulviques, mais bien leur retrait de la matrice sédimentaire. Le mélange a été agité constamment au Wrist-Action-Shaker pendant 16 heures, puis retiré de l'agitateur pendant 30 minutes (repos) et centrifugé à 2500 rpm pendant 25 minutes. Le surnageant contenant une fraction des acides humiques a été retiré à l'aide d'une pipette de verre. La matrice sédimentaire résultante a été réextraite avec le même ratio de solution de NaOH 0,1 M et un temps d'agitation de 6 h. Le surnageant de cette deuxième extraction a également été retiré de la matrice sédimentaire par une centrifugation à 2500 rpm pendant 25 minutes et la matrice a été conservée pour le retrait des composés phénoliques. Les étapes d'acidification et de purification de la procédure présentée à la figure 7 n'ont pas été réalisées considérant que la finalité n'était pas la caractérisation moléculaire et la quantification des substances humiques présentes dans la matrice sédimentaire (Swift, 1996 ; Tremblay, 2003).

Extraction des composés phénoliques

La matrice sédimentaire résultante de l'extraction des acides humiques et des acides fulviques a été rincée à l'eau déionisée trois fois permettant ainsi l'obtention d'un pH neutre après un traitement fortement basique. Plus spécifiquement, le rinçage consistait à l'ajout de 30 mL d'eau déionisée à la matrice sédimentaire, puis à l'agitation du mélange jusqu'à ce que les sédiments soient remis en suspension. Les sédiments étaient ensuite laissés à décanter pendant un minimum de 10 heures et centrifugés à 4700 rpm pendant 25 minutes afin de retirer l'eau. Après le dernier rinçage, la matrice sédimentaire humide était congelée à -80 °C pendant un minimum de 24 heures, puis lyophilisée pendant trois jours jusqu'à l'obtention d'une matrice sèche.

Les échantillons de trois grammes traités individuellement ont pu être combinés pour une masse totale d'approximativement 20 g dans des cartouches d'extraction de cellulose pour l'extraction au Soxhlet. Un volume d'approximativement 150 mL de dichlorométhane (DCM) a été ajouté au ballon. L'extraction a été réalisée par reflux pendant un minimum de 10 cycles, puis la cartouche d'extraction a été laissée à l'air libre pour que le dichlorométhane s'évapore (température ambiante). Suite à ce traitement schématisé à la figure 9, la matrice sédimentaire était considérée traitée, soit relativement exempte d'inhibiteurs connus (voir la figure 17 de l'Annexe 1 pour plus de détails quant à la procédure d'extractions chimiques ciblées réalisée sur les sédiments).

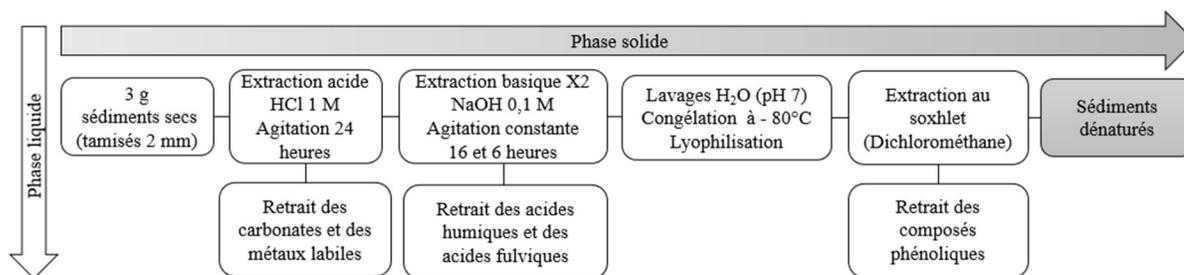


Figure 9. Procédure d'extractions chimiques ciblées pour traiter les sédiments réalisée sur des sédiments secs et tamisés. La flèche horizontale (phase solide) correspond aux traitements séquentiels des sédiments alors que la flèche verticale (phase liquide) indique les composés extraits et écartés lors des extractions.

1.5 DISCUSSION

La méthode de traitement chimique des sédiments mise en place a permis l'obtention d'une matrice relativement exempte des inhibiteurs ciblés. Les ions métalliques de type labile ont été extraits et retirés de la matrice sédimentaire lors des extractions chimiques ciblées, en raison de leur potentielle désorption pendant le processus d'extraction. La procédure utilisée pour les extraire nécessitait peu d'étapes bien qu'elle était composée d'un temps d'attente de 24 heures. Ce temps d'attente pourrait être réduit notamment par l'analyse du temps nécessaire à la désorption complète de la fraction des ions métalliques visée.

En ce qui concerne les acides humiques et les acides fulviques, seule la partie de la procédure de la Société internationale des substances humiques décrite par Swift (1996) et modifiée pour les sédiments marins par Tremblay (2003) concernant l'étape d'extraction fut réalisée. Les étapes de purification sur résine n'ont pas été réalisées puisque le but de ce travail n'était pas de caractériser les substances humiques extraites. Dans le même sens, aucune étape n'a été réalisée sous atmosphère inerte, il est donc probable que les acides humiques et les acides fulviques se soient oxydés sous l'influence de l'hydroxyde de sodium pendant l'extraction. La modification de la procédure pour exclure ces deux étapes réduit le temps et les consommables nécessaires à la réalisation de l'extraction des substances humiques de la matrice sédimentaire. Néanmoins, la procédure utilisée est composée de plusieurs étapes et considérablement longue en raison des temps d'attente. Ces derniers ont notamment été investigués et optimisés par Tremblay (2003) afin de permettre l'extraction de plus de 90 % de ces composés en seulement deux extractions. La diminution des temps d'agitation soit d'extraction en conditions basiques dans le but d'accélérer la procédure entraînerait une diminution du rendement d'extraction considérant que « le processus de dépolymérisation et de solubilisation des substances humiques soit relativement lent » selon Tremblay (2003). Ainsi, pour retirer ces composés de la matrice sédimentaire, la procédure employée semble être un bon compromis.

Les extractions chimiques ciblées pour le traitement des sédiments impliquent aussi une dégradation de l'ADN présent. En effet, les sédiments traités ont été analysés à l'aide d'un fluorimètre Qubit et de la trousse commerciale d'analyse visant à quantifier l'ADN simple et double brin présent (Qubit™ ssDNA Assay Kit, ThermoFisher Scientific). Ces analyses confirment que le matériel génétique présent dans les sédiments naturels échantillonnés a été dégradé par la séquence d'extractions chimiques ciblées réalisée (aucune détection).

La matrice sédimentaire n'a pas été caractérisée pour sa composition en ions métalliques, en acides humiques et en acides fulviques ainsi qu'en composés phénoliques après son traitement en raison de l'utilisation de méthodes d'extractions reconnues pour leur

efficacité. Par contre, la composition minérale des sédiments traités a été caractérisée, la méthode ainsi que les principaux résultats sont présentés dans le Chapitre 2 (voir figure 11). Une caractérisation exhaustive de la matrice sédimentaire traitée chimiquement aurait pu permettre d'avoir une caractérisation globale de la matrice avant son utilisation dans le cadre de l'étude de l'influence de facteurs ciblés sur la détectabilité de l'ADN ce qui amène l'idée d'un matériau de référence certifié (MRC) pour les analyses en ADNe. Un matériau de référence certifié est, par définition, un matériau dans lequel « la composition en analyte est connue avec certitude » (Skoog *et al.*, 1997) et dont la composition globale doit être semblable à celle des échantillons à traiter (Skoog *et al.*, 1997 ; CEAEQ, 2009). De ce fait, le MRC peut être traité en parallèle avec les échantillons et permettre d'évaluer l'efficacité et le succès du traitement ainsi que des analyses en laboratoire à titre de contrôle qualité ce qui pourrait s'avérer pertinent pour les études en ADNe (CEAEQ, 2009). Une matrice sédimentaire traitée de composition caractérisée possédant une faible concentration en inhibiteurs connus pourrait ainsi être utilisée pour ajouter et évaluer l'effet de divers composés sur la détectabilité de l'ADNe. En effet, l'utilisation de MRC pourrait être intégrée aux analyses d'ADNe, et ce, non seulement pour les matrices sédimentaires, mais également pour l'ensemble des matrices comme l'eau douce et l'eau salée, etc. Bien que plusieurs fournisseurs aient été consultés dont l'Institut national des standards et technologies (NIST) et le Conseil national de recherche du Canada (CNRC), aucun MRC pour l'analyse d'ADNe n'est présentement sur le marché.

D'autres composés que ceux visés par les traitements chimiques réalisés pourraient entraîner une réduction de la détectabilité de matériel génétique dans une matrice sédimentaire, ce qui fait d'autant plus valoir le besoin d'une matrice de référence certifiée et d'autres études évaluant l'influence de différents facteurs et de leur combinaison. La caractérisation des échantillons environnementaux pourrait permettre une interprétation plus juste des résultats de détection d'ADNe.

1.6 CONCLUSION

Les sédiments marins constituent une matrice complexe pour l'extraction d'ADNe en raison de sa composition variée incluant la présence potentielle d'inhibiteurs et de divers processus géochimiques. À ce jour, peu d'études s'attardent sur les effets de la composition de la matrice sédimentaire par rapport à la capacité de détection du matériel génétique, alors qu'une caractérisation pourrait s'avérer pertinente pour mieux interpréter les résultats qui découlent de l'analyse par qPCR.

La méthode établie dans ce chapitre a permis de traiter chimiquement des sédiments pour retirer les principaux inhibiteurs connus de la détectabilité de l'ADN dans l'environnement soit les ions métalliques, les acides humiques et les acides fulviques ainsi que les composés phénoliques. Il s'agit d'une première méthode mise au point dans le but de permettre d'étudier l'influence de facteurs sur la détectabilité de l'ADNe dans une matrice sédimentaire alors que les précédentes études ont évalué l'effet de composés directement au cours de la qPCR. La méthode présentée pourrait être optimisée et mise à l'échelle pour permettre la préparation d'un matériau de référence certifié pour lequel l'efficacité de détection du matériel génétique serait connue.

CHAPITRE 2

PREMIER ARTICLE

FACTEURS LIMITANT OU AMÉLIORANT LA DÉTECTION D'ADN ENVIRONNEMENTAL DANS LES SÉDIMENTS MARINS

Cet article, intitulé « Factors limiting or enhancing environmental DNA detection in marine sediments », a été rédigé par moi-même avec la collaboration des chercheuses Geneviève J. Parent (co-directrice) et Marion Chevrinais de l'Institut Maurice-Lamontagne (MPO) ainsi que celle du professeur Richard St-Louis (directeur, UQAR). Il sera soumis à une revue avec révision par les pairs pour publication. J'ai contribué à la mise en place des expériences et à leur réalisation de même qu'à la rédaction de cet article scientifique incluant le traitement des données et la conception des figures. La chercheuse Marion Chevrinais, deuxième auteure, a participé à l'élaboration des expériences en lien avec la détectabilité de l'ADN, à la rédaction et à la révision de cet article. Le professeur Richard St-Louis, troisième auteur, a participé à l'élaboration des expériences et à la mise en place de la procédure de traitement des sédiments, il a également contribué à la révision de cet article. La chercheuse Geneviève J. Parent, quatrième auteure, a participé à l'élaboration et la mise en place de l'ensemble des expériences de même qu'au traitement des données et à la conception des figures ainsi qu'à la rédaction et la révision de cet article.

Les résultats de ces travaux de recherche furent présentés oralement à de nombreuses reprises notamment à la réunion scientifique annuelle de Québec-Océan le 31 janvier 2022 (en ligne), au séminaire de recherche dans le cadre de la maîtrise en océanographie le 20 avril 2022 (présentiel, UQAR-ISMER) ainsi qu'au colloque de Chapitre Saint-Laurent s'étant déroulé les 9 et 10 juin 2022 (présentiel, Québec). Plus récemment, les résultats de cet article ont fait l'objet d'une présentation orale à Winnipeg au *Canadian Ecotoxicity Workshop* (CEW) s'étant déroulé du 3 au 5 octobre 2022.

2.1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DU PREMIER ARTICLE

Les matrices naturelles affectent la détection d'ADN environnemental (ADNe). Les ions métalliques et les acides humiques ont précédemment été identifiés à titre d'inhibiteurs de la réaction PCR. Nous avons déterminé l'effet de facteurs physicochimiques présents dans les sédiments marins sur un protocole de détection d'ADNe, de l'extraction de l'ADN jusqu'à la détection par qPCR. Nous avons traité chimiquement des sédiments estuariens subarctiques majoritairement composés de limon et de sable, à l'aide de traitements chimiques afin de retirer les composés organiques (p. ex. ADN, acides humiques) et les ions métalliques labiles. De l'ADN exogène a ensuite été ajouté à chacun des aliquots de la matrice préalablement au protocole de détection. La détection consiste en l'extraction et la détection par qPCR avec sonde TaqMan™. Nous avons montré que la détection d'ADN exogène a augmenté proportionnellement avec la proportion de silt. Nous avons ensuite caractérisé l'effet d'ions métalliques (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) et d'acides humiques sur la détection d'ADNe en utilisant une matrice composée à 30 % de limon. La détectabilité de l'ADN était plus faible à des concentrations naturelles d'ions calcium, fer et manganèse observées dans les sédiments marins de surface de l'est du Canada. Alternativement, la présence d'ions cuivre ou d'acides humiques dans la matrice environnementale a augmenté la détection d'ADNe. Des tests additionnels ont suggéré que les acides humiques chélatent des inhibiteurs résiduels dans les sédiments traités. Nous avons confirmé que l'addition d'un chélatant tel que l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) avant l'extraction de l'ADN peut améliorer les détections d'ADNe. Ensemble, nos découvertes mettent en évidence de nouvelles limitations pour les détections d'ADNe et amènent des pistes pour l'optimisation des protocoles de détection d'ADNe applicables à plusieurs matrices environnementales.

2.2 FACTORS LIMITING OR ENHANCING ENVIRONMENTAL DNA DETECTION IN MARINE SEDIMENTS

Authors: Laury-Ann Dumoulin^{1,2,*}, Marion Chevrinai¹, Richard St-Louis³,
Geneviève J. Parent¹

¹ Laboratory of Genomics, Maurice Lamontagne Institute, Fisheries and Oceans Canada, 850 route de la mer, CP 1000, Mont-Joli (Québec), G5H 3Z4, Canada

² Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, Rimouski (Québec), G5L 2Z9, Canada

³ Département de biologie, chimie et géographie, Université du Québec à Rimouski, 300 allée des Ursulines, Rimouski (Québec), G5L 2Z9, Canada

* Corresponding author:

L.-A. Dumoulin

lauryanndum@gmail.com

2.3 ABSTRACT

Natural matrices affect environmental DNA (eDNA) detections. Metal ions and humic acids were previously identified as inhibitors of PCR reactions. Yet, factors affecting the sample lysis and DNA extraction stages are mostly unknown. We assessed the effect of physicochemical factors present in marine sediments on an eDNA detection protocol, from the DNA lysis to the qPCR detection. We chemically treated sub-arctic estuarine sediments, mainly composed of silt and sand, with chemical treatments to remove organic compounds (e.g., DNA, humic acids) and labile metal ions. Exogenous DNA was then added to each matrix aliquot prior to eDNA extraction and detection using commercial kits and probe-based qPCR detection. We showed that DNA detectability increased proportionally with silt proportions. We then characterized the effect of metal ions (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) or humic acids on eDNA detections using a 30% silt matrix. DNA detectability was lower at natural concentrations of calcium, iron and manganese ions observed in surface marine sediments in eastern Canada. Alternatively, the presence of copper ions or humic acids in the environmental matrix increased DNA detectability. Additional tests suggested that humic acids chelate inhibitors still present in the chemically treated sediments. We confirmed that adding a chelating compound such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) prior to the DNA lysis can improve eDNA detections. Together, our findings highlight new limitations of eDNA detections and provide avenues for optimization of eDNA detection protocols applicable to multiple environmental matrices.

Keywords:

eDNA, inhibitors, marine sediments, calcium, copper, iron, manganese, humic acids, granulometry, EDTA

1. INTRODUCTION

Environmental DNA (eDNA) detection emerged over the past decades to improve environmental management (Goldberg *et al.*, 2016; Baillie *et al.*, 2019; Deiner *et al.*, 2021; Thalinger *et al.*, 2021). However, some factors affect eDNA detections and can lead to false negatives (Lacoursière-Roussel *et al.*, 2016; Loeza-Quintana *et al.*, 2020; Nevers *et al.*, 2020). Such factors are poorly known. Improving our understanding of factors affecting eDNA detections will help to increase their reliability. This is crucial to reduce variability in eDNA detection of rare species, where DNA concentrations are low (Nevers *et al.*, 2020; Lacoursière-Roussel and Deiner, 2021). Improvements to methods currently used would greatly benefit eDNA scientists (Loeza-Quintana *et al.*, 2020; Burian *et al.*, 2021; Thalinger *et al.*, 2021).

Factors recognized to influence DNA detectability are mainly associated to two stages of sample treatment and analysis, namely DNA extraction and detection. At the DNA extraction stage, methods may also coextract organic and inorganic compounds, affecting the detection stage. PCR inhibition may be observed if one or multiple coextracted compounds interact with the enzymatic reaction reducing partially or totally the amplification efficiency (Schrader *et al.*, 2012; Buxton *et al.*, 2017; Lance and Guan, 2020; Loeza-Quintana *et al.*, 2020). Some of the major PCR inhibitors identified are calcium, copper, iron (Fe^{2+} , Fe^{3+}), zinc, immunoglobulin, and collagen in forensics sciences (Schrader *et al.*, 2012; Combs *et al.*, 2015; Kuffel *et al.*, 2021).

Natural matrices also contain compounds that limit eDNA detections (Buxton *et al.*, 2017; Uchii *et al.*, 2019; Burian *et al.*, 2021). One of the main compounds reported in eDNA studies as inhibiting qPCR reactions are humic acids, which are ubiquitous in soil and coastal water samples (Sutlovic *et al.*, 2005; Tremblay and Gagné, 2007). Other inhibitory compounds may also be at high concentrations in environmental samples. Calcium is part of the five most abundant chemical elements in the earth crust and the second most abundant divalent cation in seawater with a concentration of approximately $410 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Eisenhauer,

2011). Calcium binds competitively with essential cofactor magnesium to the polymerase which reduces the amplification efficiency during PCR (Schrader *et al.*, 2012; Kuffel *et al.*, 2021). Copper is a trace element naturally present in the earth crust and the environment; its concentration is known to increase with anthropogenic activities. Copper is also known to accumulate in marine sediments in concentration over $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Blossom, 2001). Iron is naturally present in the environment with concentrations ranging from $1.67 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ to $167 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in the ocean (Street and Paytan, 2005). Calcium, copper and iron ions have all been confirmed as PCR inhibitors in forensics studies due to their presence in bones, bullet, metal wires, and blood (Kuffel *et al.*, 2021). The effect on the detection stage of other abundant compounds present in most environments, such as manganese, is unknown. Manganese is a divalent cation naturally occurring in high concentrations in soils and water in the range of 40 to $900 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 10 to $10\,000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively (Pinsino *et al.*, 2012).

The effect of inhibitory compounds was studied mostly at the detection stage, as an additive to the qPCR reactions. The inhibitory effect is usually assessed using an internal positive control (IPC) and by quantitative PCR (qPCR) (Jane *et al.*, 2015; Goldberg *et al.*, 2016; Thalinger *et al.*, 2021; Loeza-Quintana *et al.*, 2020; Burian *et al.*, 2021). The IPC is generally an exogenous DNA added to the qPCR reaction solution. Inhibition is inferred if the number of amplification cycles (C_q) necessary to detect the IPC is different by 1 to 3 cycles from the expected value (i.e., C_q value from a qPCR reaction using a known DNA concentration diluted in sterile water; Turner *et al.*, 2015; Goldberg *et al.*, 2016; LeBlanc *et al.*, 2020; Sakata *et al.*, 2020). However, determining the effect of inhibitory compounds at the detection stage is not sufficient to understand factors that influence DNA detectability in environmental matrix. Their effects during the DNA extraction stages should also be studied and defined to optimize procedures and to improve eDNA detections in the future.

Sediments are identified as challenging since they naturally contain more inhibitors than other environmental matrices (Pawlowski *et al.*, 2021). The difficulty in detecting eDNA from sediments may explain why they are yet poorly studied (Corinaldesi *et al.*, 2008; Torti *et al.*, 2015; but see Turner *et al.*, 2015; Geraldi *et al.*, 2020; Sakata *et al.*, 2020). Still,

some recent studies have identified factors influencing eDNA detections (Kanbar *et al.* 2020, Nkuna *et al.* 2022). It has been shown that sediments with high proportions of clay and organic matters increased the DNA adsorption (Kanbar *et al.* 2020). Recently, Nkuna *et al.* (2022) conducted an experiment to improve the DNA recovery of microbial communities in mine tailing's samples affected by metal ions contamination. Their results suggest that the DNA recovery is improved with the addition of a chelating compound such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Besides, the DNA extraction stage has also been improved in recent years with the use of commercial or house-made procedure including additional purification steps, which lead to DNA extracts with less inhibitors (QIAGEN, 2020; Turner *et al.*, 2015; Lever *et al.*, 2015).

In this study, we aimed to identify factors influencing DNA detectability in marine sediments. We studied the influence of physico-chemical factors in sediments, from a sub-arctic region (St. Lawrence Estuary, Canada), by first chemically treating sediments and then testing the effect of single factors on DNA detectability. Targeted factors were granulometry, metal ions (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}), and humic acids. We identified factors limiting and enhancing DNA detectability.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Sampling and sediments granulometry

Intertidal sediments were collected at low tide in May 2021 from two sites with contrasting granulometry based on visual observation, Anse à Wilson (N48.3558°, W68.7961°, WGS 84, sand) and Baie des Cochons (N48.3519°, W68.7973°, WGS 84, sand and silt), at the Parc National du Bic (Rimouski, Canada). Located in the Estuary of St. Lawrence, this area is protected and managed for conservation and recreation purposes, with minimal anthropogenic impacts. Samples were collected by coring using a modified syringe (140 mL) as described in Pawlowski *et al.* (2021). Samples were sieved to keep sediments particles under 2 mm (nylon sieve). Then, five aliquots of 0.25 mg sediments for each site

were prepared in PowerBeads tubes and stored at - 80°C until the exogenous DNA addition step (see section 2.3). Remaining sieved sediments (approx. 500 g) were dried at 105 °C during 24 hours prior to storage in hermetic Nalgene bottles at room temperature until sediments chemical treatments. The size of sediments particles was determined at the *Laboratoire d'analyse des particules et des surfaces* from the Université du Québec à Rimouski - Institut des sciences de la mer de Rimouski.

2.2 Sequential extractions procedure on sediments and mineral composition analysis

A total of 70 dried sediments aliquots of three grams were processed through a sequence of treatments to remove organic and most inorganic factors known to affect DNA detection (Figure 10). The sequence of treatments consisted of three combined extractions procedures to remove labile metals, humic and fulvic acids, and phenolic compounds, respectively. Hydrochloridric acid (HCl, 1 M) was first used to extract labile metals. Samples were agitated for 24 hours and, centrifuged (2,500 rpm over 25 minutes) to remove the acidic solution (Snape *et al.*, 2004; CEAEQ, 2012). The second treatment consisted in two successive extractions with sodium hydroxide solutions (NaOH, 0.1M) to remove humic and fluvic acids (Swift, 1996, Tremblay, 2003). Sediments were then washed three times with demineralized water (H₂O) to restore neutral pH and then lyophilized. The third treatment was by Soxhlet extraction using dichloromethane to remove organic compounds such as phenolic and lipids. Chemically treated sediments were stored in hermetic Nalgene bottles at room temperature until sample preparation.

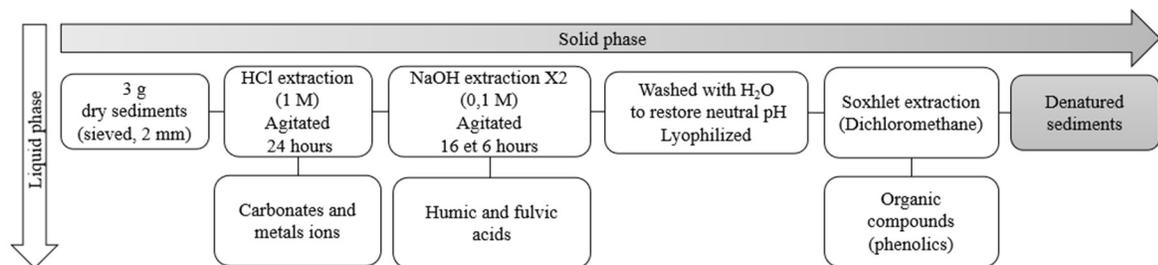


Figure 10. Sequential extractions procedure realized on sieved dry sediments. The solid phase arrow corresponds to the sequential treatments of sediments while the liquid phase arrow indicates the compounds extracted and discarded in some treatments.

The mineral composition analysis was done with approximately 1 g of chemically treated sediments of each site using X-ray diffraction (XRD) with a PANalytical X'Pert Powder diffractometer at the *Laboratoire de géochimie et minéralogie des sédiments* from UQAR-ISMER according to the methods developed by Eberl (2003) and Butler and Hillier (2021). Samples scans were realized from 5° to 65° 2θ in steps of 0.02° 2θ with a counting time of 2 s per step and then, converted into mineral weight percent and modelized using the *powdR* program (Butler and Hillier, 2021).

2.3 Preparation of sediment aliquots for experiments

Five chemically treated sediment matrices were used to test the effect of granulometry whereas a single treated sediment matrix was used to test the effect of single compounds on DNA detectability. For granulometry experiment, we used a total of five treated sediment matrices from various localities and proportions: 1) Anse à Wilson, 2) Baie des Cochons, 3) 75-25% Anse à Wilson - Baie des Cochons, 4) 50-50% Anse à Wilson - Baie des Cochons, and, 5) 25-75% Anse à Wilson - Baie des Cochons. For the single compound experiments, a mix of 50-50% Anse à Wilson - Baie des Cochons of treated sediment was used.

A total of 256 treated sediment matrices were aliquoted in 0.25 g in PowerBeads tubes, including five aliquots prepared for each sediment matrices or concentrations tested ($n=245$) and 11 extraction negative controls present across all experiments (Table 3). Sediments were

then rehydrated with artificial seawater (sea salts, S9883, Sigma-Aldrich) at a salinity of 27.3 g·L⁻¹. Note that calcium was the only compound tested in the experiment that was present in seawater (concentration 110 mg Ca²⁺·kg⁻¹).

Table 3. Number of replicates of treated sediments used for each factor affecting environmental DNA detections. The proportions of sediments used from Anse Wilson (first) and Baie des Cochons (second) are presented as columns.

Anse Wilson – Baie des Cochons %	100 – 0 %	75 – 25 %	50 – 50 %	25 – 75 %	0 – 100 %	Extraction negative controls
Granulometry	5	5	5	5	5	5
Calcium	-	-	35	-	-	1
Iron	-	-	35	-	-	1
Manganese	-	-	35	-	-	1
Copper	-	-	35	-	-	1
Humic acid	-	-	35	-	-	1
EDTA	-	-	45	-	-	1

Metal ions, humic acids, or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were added to experiments testing for a single compound effect. The following compounds were used: calcium (CaCl₂, #L13191, Alfa Aesar), iron (FeCl₃ 6 H₂O, #236348, Sigma-Aldrich), manganese (MnCl₂ 4 H₂O, #54879, Anachemia), copper (CuSO₄ 5H₂O, Fisher Scientific), humic acid sodium salts (#H16752, Sigma-Aldrich), Sodium (NaCl, # BDH9286, VWR), and EDTA (0.5M pH 8.0 molecular grade, #PR-V4321, Promega, Fisher scientific). First, compounds were each diluted in a concentrated solution with artificial seawater. The concentrated solution was then diluted to obtain seven concentrations of metal ions and humic acids, and nine concentrations of EDTA (mat. Sup. Appendix 1, table 4). The range of concentrations tested for each compound was within levels observed in the St. Lawrence River, except for the highest concentration which was twice as much as the maximal value (Environnement Canada et Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des

Parcs du Québec, 2007). Then, 103 μL of compound solution was added to each dry sediment aliquot. For extraction controls, the same volume of seawater was added to sediments. Sediment aliquots were then agitated overnight at 4°C.

Exogenous DNA was added two hours prior to DNA extraction to all sediment aliquots, except for extraction negative controls in which seawater was added, in a volume of 15 μL . We also used a DNA extraction positive control for each experiment which consisted in exogenous DNA added to 250 μL of artificial seawater. The addition of exogenous DNA consisted in 2000 copies of a linearized plasmid (GENEWIZ, Azenta Life Sciences) quantified by droplet digital PCR, containing a fragment of the CO1 sequence (137 bp) from the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Chevrinais *et al.*, 2023). This species has never been observed in the Parc National du Bic but low concentrations of eDNA were detected in rivers south to the park in 2020 (~135 km, Chevrinais *et al.*, 2023). Besides, any DNA present in natural samples was chemically removed during the sequential extractions procedure (confirmed with a QubitTM assay and the ssDNA assay kit, Invitrogen, #Q10212).

2.4 DNA extraction and qPCR detections

DNA was extracted for the natural and treated sediment aliquots using the DNeasy® PowerLyzer® PowerSoil® DNA extraction Kit (QIAGEN, 2020). The same protocol was also used for the artificial seawater extraction positive control realized with each experiment. We modified the protocol slightly by adding all the lysis buffer (approx. 1300-1400 μL) to the purification step and then to the centrifugation column instead of a fixed volume of 750 μL . DNA was eluted in 100 μL of C6 buffer (10 mM Tris).

We then detected exogenous DNA using a targeted quantitative PCR (qPCR) assay for a 137 bp fragment of the CO1 gene of the Chinese mitten crab (Chevrinais *et al.*, 2023). Briefly, the method consisted in the following reaction conditions: 95°C for 10 min and 45 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. TaqPathTM ProAmpTM 2x Master Mix (Thermo Fisher ScientificTM, Waltham, USA) was used with a volume of 10 μL by reaction. The final volume of reaction was 20 μL including 0.96 μL of primers (480 nM), 0.4 μL of FAM-

labeled MGB hydrolysis probe (200 nM), 0.8 μ L of bovine serum albumin (BSA, 1%), 3.88 μ L of PCR grade water, and 3 μ L of DNA extract (Chevrinais *et al.*, 2023). All liquid handling for quantitative PCR was made with aerosol barrier pipette tips in an ultraclean room for plate preparation to minimize the risk of contamination (Chevrinais *et al.*, 2023). All reactions were performed using the AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies, California, USA)

Serial dilution of the linearized plasmid was done to produce a standard curve of eight DNA concentrations ranging from 1 to 2 000 000 copies per reaction in six replicates. The R^2 value determined by the Agilent AriaMx Software was 0.994 and the efficiency of amplification was 100.1 %. Quantification cycles (Cq) were obtained as numbers of amplification cycles necessary so that fluorescence generated by the amplification products cross the threshold fixed at 0.035. The limit of detection with a reliability of 95 % of 1 copy/reaction was determined using a curve fitting approach with the R-script provided by Klymus *et al.* (2019).

We then assayed all 245 DNA extracts with three qPCR replicates. To assess for cross-contamination, three negative template controls composed of PCR grade water instead of DNA extract in the reaction mixture were used for each 96-wells plate. To assess amplification efficiency between plates, a qPCR positive control of 80 DNA copies per reaction was used on every sample plate.

Mean Cqs were calculated from qPCR triplicate results and used to determine DNA copies from the standard curve equation. If a replicate had no amplification (No Cq) but the two other replicates did have amplification, the No Cq replicate was removed from the mean calculation. When all three replicates showed no amplification, a Cq of “45” was assigned, resulting in 0 DNA copies per reaction. DNA detectability was calculated according as the proportion of DNA copies detected over 60 DNA copies added to the sediment aliquot (3 μ L of a 100 μ L DNA extract with 2000 copies).

2.5 Statistical analyses

A linear mixed-effect model was used to test for a granulometry effect. Silt content was used as a fixed effect while the mean Cq per sediment aliquot was considered as a random effect in the model.

Metal ions, humic acids and EDTA results were analyzed to assess the effect of their increasing concentrations on DNA detectability. For each experiment, normality and homoscedasticity were verified for the residues of an analysis of variance (ANOVA) with a Shapiro-Wilks test and a Levene test, respectively. Normality and homoscedasticity assumptions were not satisfied for metal ions and humic acids. Thus, we performed non parametric tests, the Kruskal-Wallis, to determine differences on the DNA detectability. Differences in proportion of DNA copies detected between concentrations were then tested with a post hoc Dunn test with the Benjamini-Hochberg method, which controls for the false discovery rate. For EDTA, differences in proportion of DNA copies detected between concentrations were then assessed with a post hoc Tukey test. All statistical analyses considered a threshold of $P < 0.05$ to identify significant differences and were performed in R version 4.1.3. (2022-03-10) (R Core Team, 2022).

3. RESULTS

3.1 Sediments characteristics prior and following chemical treatments

The humidity and particle size < 2 mm differed between Anse à Wilson and Baie des Cochons. The humidity of natural samples was approximately 24 % for the Anse à Wilson and 47 % for the Baie des Cochons. At the Anse à Wilson site, sediments collected were mainly composed of sand (93%; $> 63 \mu\text{m}$ to 2 mm) with a low proportion of silt (7%; 2 to 63 μm). For the Baie des Cochons site, sediments were composed more equally of sand (44 %) and silt (54 %), with a very low clay proportion (2%; $< 2 \mu\text{m}$).

Chemically treated sediments from the Anse à Wilson and the Baie des Cochons sites had similar bulk mineral content. Mineral composition analysis results showed higher proportions of quartz, plagioclase, K-feldspar, illite and chlorite at both sites (figure 11).

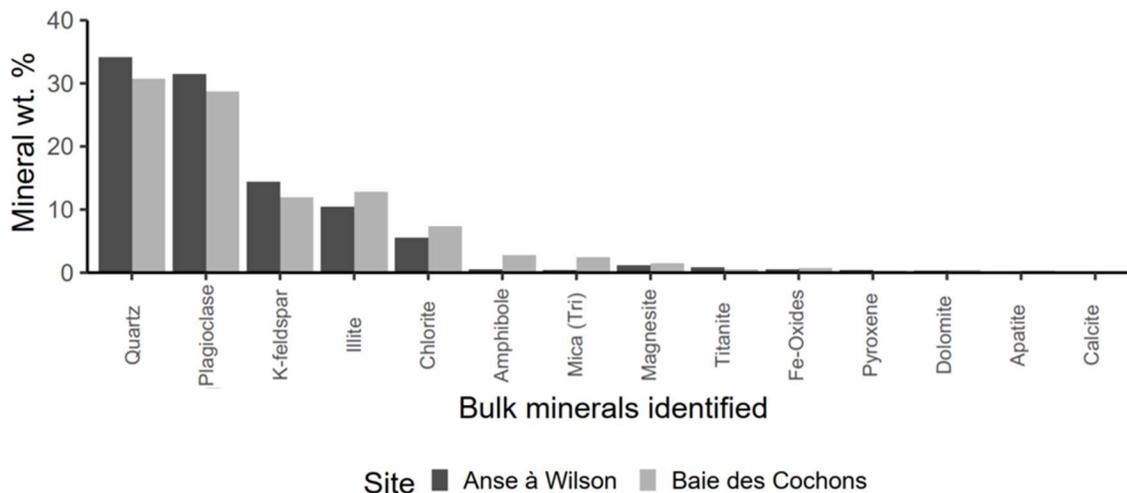


Figure 11. Mineral composition of chemically treated sediments from the samples collected at two sites.

3.2 Factors affecting DNA detectability

All negative controls for extraction or qPCR showed no Cq. DNA detectability in the artificial seawater extraction positive control (no sediments) was 4 ± 1 % (mean \pm SEM). In natural sediments matrices from both sites, the DNA detectability of the exogenous DNA added prior to the extraction was 12 ± 4 % (mean \pm SEM) for the Anse à Wilson site and $8,4 \pm 1,7$ % (mean \pm SEM) for the Baie des Cochons site. The positive controls for qPCR showed less than 2 % of the variance between plate amplification.

3.2.1 Granulometry

We first tested the particle size effect on DNA detectability using chemically treated sediments. DNA detectability increased proportionally to silt ratio (Figure 12, linear mixed-effects model $F_{1,66} = 43.2$, $P = 9.191e-9$). Granulometry affected DNA detections linearly. Variance of DNA detectability also augmented with increasing silt ratio (Figure 12).

The chemically treated sediment matrix afterwards used to test the effect of a single compound was composed of ~ 30-70 % of silt-sand. We detected 6.3 ± 1.0 % DNA copies (mean \pm SEM) in this sediment composition (Figure 12). This value was set as the reference state for the following experiments.

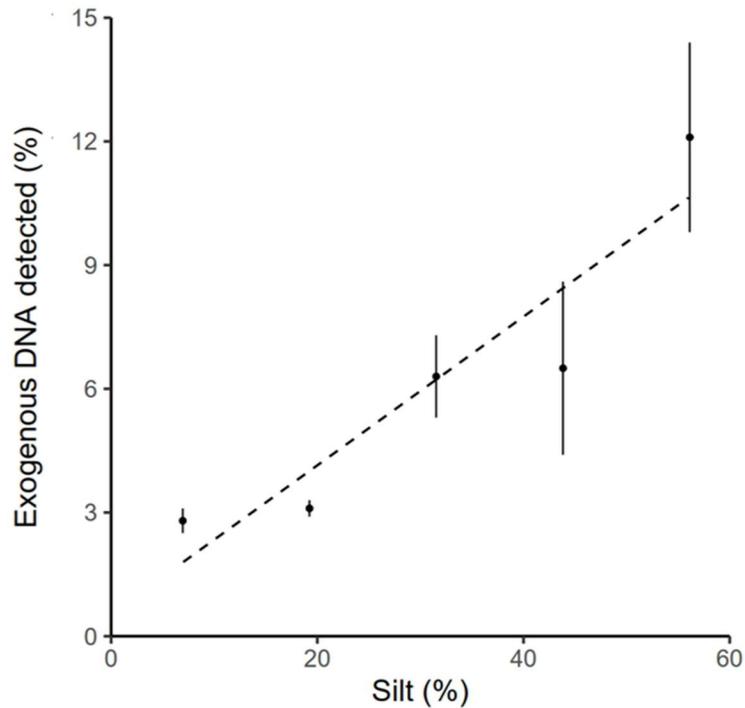


Figure 12. Effect of granulometry from the sedimentary matrix on the DNA detectability. Sediments were mainly composed of silt and sand. The mean and standard error are presented. The dash line represents the linear mixed-effect model of silt proportion on exogenous DNA detected.

3.2.2 Metal ions

Metal ions affected positively or negatively DNA detectability in chemically treated sediments (Figure 13). All metal ions affected DNA detectability non linearly. In fact, lower DNA detectability was observed for high but also low concentrations of calcium, iron, and copper. For manganese, only high concentrations lowered DNA detectability.

DNA detectability decreased with increasing concentration of calcium (Figure 13A). Proportions of DNA detected were lower at concentrations between 130 and 150 mg kg⁻¹, which are slightly higher than that in artificial seawater (110 mg kg⁻¹). At concentrations from 320 to 530 mg kg⁻¹ DNA detectability was similar to the reference state. DNA detectability decreased steeply for calcium concentrations between 530 and 4,270 mg kg⁻¹. The proportion of DNA detected was null at 20,890 mg kg⁻¹ of calcium added to chemically treated sediments.

DNA detectability was greater than the reference state at copper concentrations between 20 and 80 mg kg⁻¹ (Figure 13B). The addition of copper ions increased DNA detectability to 14,0 ± 1,9 % (mean ± SEM) at a concentration of 80 mg kg⁻¹ (Figure 13B). Lower concentrations than 20 mg kg⁻¹ and higher concentrations than 200 mg kg⁻¹ of copper did not affect DNA detectability. DNA was detected at all copper concentrations tested.

DNA detectability decreased with increasing concentration of iron (Fe³⁺, Figure 13B). As for calcium, we observed lower DNA detectability at low (40 to 400 mg kg⁻¹) and high (10,000 to 30,000 mg kg⁻¹) iron concentrations but not at intermediate concentrations (2,000 and 4,000 mg kg⁻¹). No DNA was detected within iron concentrations of 20,000 and 30,000 mg kg⁻¹.

Manganese ions lowered DNA detectability at concentrations ≥ 400 mg kg⁻¹ (Figure 13C). DNA detectability was almost null at 400 mg kg⁻¹ and null at 20,000 mg kg⁻¹.

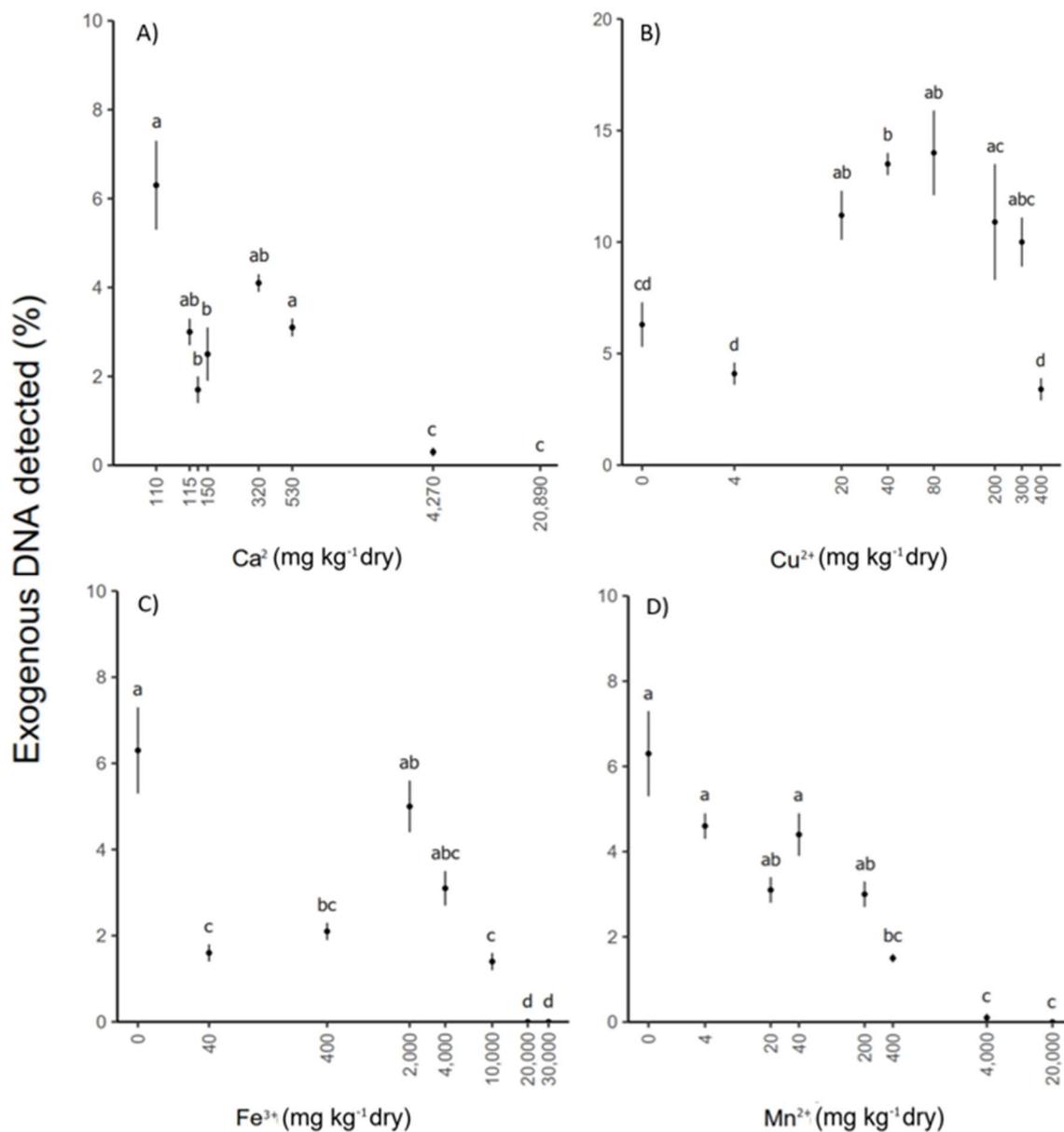


Figure 13. Effect of metal ions concentrations on the DNA detectability. The mean and standard error are presented. Letters indicate differences according to P < 0.05 (Kruskal-Wallis nonparametric test followed by a post hoc Dunn test)

3.2.3 Humic acids

DNA detectability improved with concentrations of humic acids greater than 2,000 mg kg⁻¹ in the chemically treated sediments (Figure 14). The highest concentration of humic acids tested (10 000 mg kg⁻¹) had the highest DNA detectability (23.1 ± 2.4 %, mean ± SEM) but this value was not significantly different with from those at 2,000 and 4,000 mg kg⁻¹. DNA detectability seemed to increase exponentially between 400 and 4,000 mg kg⁻¹ of humic acids and to plateaued between 4,000 and 10,000 mg kg⁻¹ of humic acids.

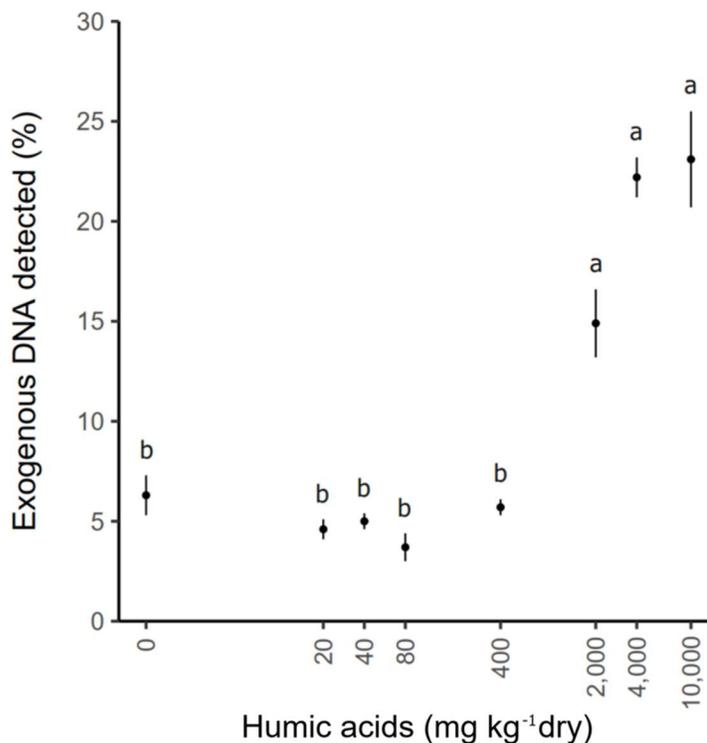


Figure 14. Effect of humic acids concentrations on the DNA detectability. The mean and standard error presented. Letters indicate differences according to $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis nonparametric test followed by a post hoc Dunn test)

Our results for humic acids were opposed to those from previous publications (Sutlovic *et al.*, 2005; Matheson *et al.*, 2010; Lance and Guan, 2021). We hypothesized that humic acids in our experiment 1) also contained sodium salt that improved DNA detectability, 2) interfered with fluorescence and biased DNA detection results, 3) played a role in chelating

inhibitors prior to the extraction stage that improved DNA detectability. First, no increase in DNA detectability was observed with increasing sodium chloride concentration (mat. sup. Appendix 2, Figure 16). Second, we tested if chemically treated sediments containing a humic acids concentration of 10,000 mg kg⁻¹, no exogenous DNA, and processed through DNA extraction emitted fluorescence with a Qubit™ assay for single strand DNA. Humic acids did not emit fluorescence in these conditions. Third, we used EDTA to test if adding a chelating agent prior to the extraction stage could improve DNA detectability. DNA detectability increased with EDTA concentrations from 6,000 to 24,000 mg kg⁻¹ (Figure 15). A steep decline in DNA detectability was observed between the two highest EDTA concentrations tested (20,000 and 29,200 mg kg⁻¹).

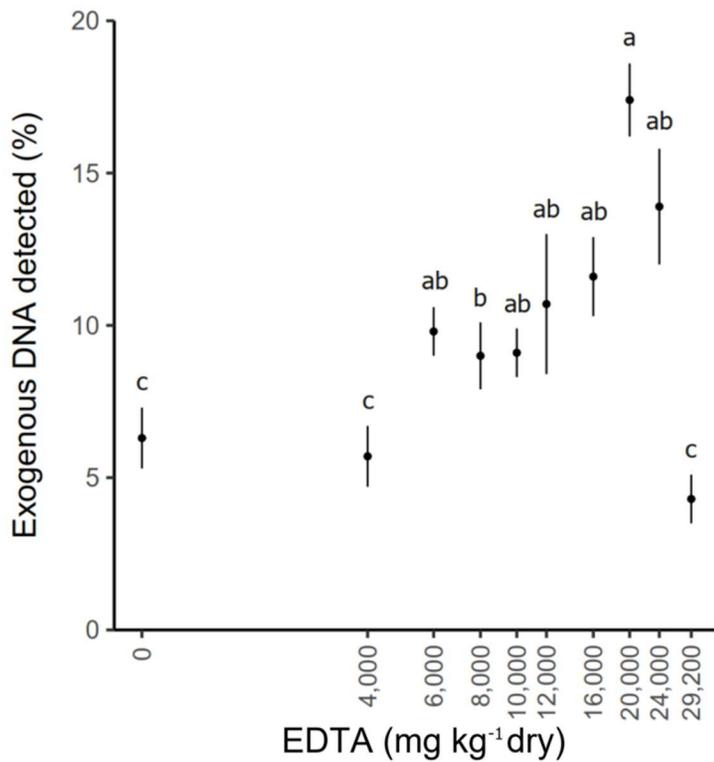


Figure 15. Effect of EDTA concentrations on the DNA detectability. The mean and standard error presented. Letters indicate differences according to $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis nonparametric test followed by a post hoc Dunn test)

4. DISCUSSION

Our study identified seven factors affecting eDNA detections in marine sediments. These factors reduced or enhanced eDNA detection at some concentrations. Our results also showed that trends in DNA detectability with increasing concentrations differed among compounds. Those variable trends highlighted that DNA detectability was not only affected at the detection stage but also at the DNA extraction stage of an eDNA workflow. Together, our results provided new insights in the interpretation of eDNA detections that will be discussed below.

4.1 Granulometry

Our results confirmed that granulometry influences DNA detectability. First, sediments with a high proportion of silt had greater DNA detectability than sediments with a high proportion of sand. As chemically treated sediments from both sites (Anse à Wilson and Baie des Cochons) had similar mineral composition, the difference observed in DNA detectability among sediments were likely due to granulometry. Our results were concordant with some previous studies, showing that the ability of DNA adsorption increases with decreasing particle size (Levy-Booth *et al.*, 2007; Torti *et al.*, 2015; Buxton *et al.*, 2017). Those studies showed that DNA adsorption of clay is a hundred time higher that of sand. Difference in surface areas, and the number of binding sites, explained differences observed among particle sizes in DNA adsorption (Levy-Booth *et al.* 2007). Second, we also observed that the DNA detectability was more accurate (i.e., less variance) among sediment aliquots composed mostly of sand that those with high proportions of silt. Previous studies also showed the lower variability in DNA quantity of sand-based matrix compared to that of clay (Lekang *et al.*, 2015; Geraldi *et al.*, 2020).

4.2 Compounds limiting eDNA detections in marine sediments

Calcium, iron, and manganese ions reduced DNA detectability in chemically treated marine sediments. Forensics studies had reported the negative effect of calcium and iron ions

at the detection stage, in the polymerase chain reaction (Schrader *et al.*, 2012; Combs *et al.*, 2015; Kuffel *et al.*, 2021). Our results showed for a first time that manganese may also limit DNA detections at concentrations observed in marine sediments.

Calcium decreased DNA detectability at concentrations as low as 130 and 150 mg kg⁻¹. Calcium ions are naturally found in seawater at 410 mg kg⁻¹ (Eisenhauer, 2011), which did not affect DNA detectability. However, higher calcium concentrations may be observed in some marine environments. The dissolution of calcium carbonates deeply in the ocean or the greater concentrations of calcium ions in coral systems than in open waters could limit eDNA detections. Note that the inhibitory effect induced by calcium ions could be reversed by the addition of magnesium ions or EGTA (Schrader *et al.* 2012, Kuffel *et al.* 2021).

Iron decreased DNA detectability, in a similar trend as calcium. Iron is essential for marine organisms and its availability controls for the phytoplankton productivity (Gledhiir and Buck, 2012). Iron influxes to the marine sediments result in enriched clay and mud at the ocean bottoms (Street and Paytan, 2005). Iron ions are also known to form complexes with organic molecules which could result in crosslinks with genetic material (Street and Paytan, 2005). Iron binding to DNA could explain the reduce ability to recover DNA in sedimentary matrix containing high concentrations of metal ions (Combs *et al.*, 2015). Interestingly, we noted the precipitation of ferrous ions at 20,000 and 30,000 mg kg⁻¹ concentrations during the lysis step of the DNA extraction protocol. The red and white layers observed during lysis at those concentrations could be DNA molecules binding to iron and sediment, resulting in no DNA molecules recovered. According to Schrader *et al.* (2012), the addition of bovine serum albumin (BSA) could resolve iron-induced inhibition. The BSA is a commonly used additive in PCR reaction solution to improve amplification of environmental template from DNA extracts containing inhibitors (Farrel and Gladys, 2012).

Our results for calcium and iron suggested that DNA detectability was affected at two stages of the eDNA workflow. At high concentrations, these compounds were likely co-extracted during the extraction stage and limited detection due to PCR reaction inhibition. Their presence in PCR reactions reduced the polymerase amplification efficiency, as

observed in multiple studies (Schrader et al., 2012; PCR detection of microbial pathogens, 2013; Combs *et al.*, 2015; Kuffel *et al.*, 2021; Nkuna *et al.*, 2022). At low concentrations, the presence of calcium and iron may have affected DNA adsorption on sediment and consequently reduced recovery during DNA extraction (Pietramellera *et al.*, 2009). Those hypotheses could be further tested by the addition of different exogenous DNA (different plasmids) at known concentrations at the extraction and detection stages of the eDNA workflow. We added exogenous DNA at the extraction stage and inferred inhibition at the detection stage based on a bimodal pattern of DNA detections. Adding a different plasmid at both stages and contrasting their DNA detection patterns would identify how each stage affect DNA detectability.

Manganese ions also decreased DNA detectability. According to our results, DNA detectability may be reduced at the manganese's reduction interface in sediments due to redox pathways in the manganese cycle. DNA detectability according to our results would also be lower in some oceans where manganese-based nodules are covering the bottom, such as the Pacific, the Atlantic and the Indian Oceans (Pinsino *et al.*, 2012; Townsend, 2012; Joseph, 2017). Moreover, concerns have been raised in the last century about the increasing manganese contamination resulting from high production rates of manganese-based compounds (Murnyak *et al.*, 2009; Pinsino *et al.*, 2012). We did not identify any clear role of manganese ions at the two stages of sample treatment and analyses for DNA detection workflow. However, a previous study reported manganese ions interact with phosphate groups and DNA base pairs in water. They reported that manganese ions tend to break hydrogen bonds between base pairs, and they observed DNA aggregation (Polyanichko *et al.*, 2004). For this specific metal ion, the integrity of the genetic material may cause lower DNA detectability.

4.3 Compounds enhancing eDNA detections from marine sediments

Humic acids and EDTA improved DNA detections. Previous studies have shown that DNA detections were limited with the addition of various organic molecules, such as humic

and tannic acids, to PCR reactions (Matheson *et al.*, 2010; Lance and Guan, 2020). In our study, we observed an increase in DNA detectability with increasing concentrations of humic acids. Our method was designed to reproduce a complete eDNA workflow on sediment samples which are processed through purification steps at the DNA extraction stage. Those steps are aimed to remove known inhibitory compounds from the DNA extract. In our study, humic acids were likely removed during the extraction stage, with the commercial kit used and adapted for soils. Discrepancy between our results and those from inhibition tests at the detection stage (Matheson *et al.*, 2010; Lance and Guan, 2020) are likely explained by differences in role that played humic acids. In our study, humic acids could act as chelating agents on inhibitors still present in the chemically treated sediment. To validate our assumption, we added EDTA, a chelating agent, prior to DNA extraction. This compound is used in molecular laboratories and is commonly added to various buffers, such as Tris-EDTA used for DNA conservation (Sambrook and Russel, 2001). EDTA is also known as an inhibitor of PCR reactions since it chelates metal ions such magnesium, being essential for the polymerase activity (Sambrook and Russel, 2001; Schrader *et al.*, 2012). In our study, the increase of DNA detectability observed for sediments either containing humic acids or EDTA suggests that the addition of a chelating agent during the preservation or the lysis steps may improve the recovery stage of an eDNA workflow. Note that the maximum DNA detectability observed was 17.4 ± 1.2 % with EDTA while it was 23.1 ± 2.4 % with humic acids. This result suggested that other chelating compounds than EDTA may be more powerful to improve the DNA recovery at the first stage of an eDNA workflow.

DNA detectability was not reduced with the addition of copper in contrast with other metal ions tested. DNA detectability was maintain or improved at copper concentrations tested (Figure 13). However, copper ions were identified as a PCR inhibitor in forensics sciences for its presence in bullets (Kuffel *et al.*, 2021). The commercial extraction kit used is likely efficient at removing copper, as it is a well-known inhibitor. Our results then suggested that copper may improve the recovery stage in an eDNA workflow. Its specific role is unknown. A previous study realized by Combs *et al.* (2015) tested by spectrophotometry the influence of copper on a 6-FAM probe used for the DNA detection.

Their results reported no increase in fluorescence level when copper was added to 6-FAM probe solutions (Combs *et al.*, 2015). Our hypothesis is that copper ions facilitate the DNA extraction procedure prior to the PCR reaction.

4.4 Improvements of eDNA detections in the future

In this study, we aimed to identify factors influencing eDNA detection. Our methodological approach allowed the characterization of the effect of single factors limiting or enhancing eDNA detections in marine sediments. We used chemically treated sediments to remove acknowledged inhibitors in the literature and then to add predetermined concentrations of a single potential inhibitor. A clear strength of this approach is that it allowed to identify the effects at multiple stages these compounds may have on DNA detectability. Results have shown that DNA detectability is not only affected at the detection stage but also at the extraction stage. Furthermore, the methodological approach allowed results comparisons based on a reference state. Comparison of DNA detectability between a reference state and several treatments is a promising analytical approach to improve methods and assess differences in sample treatments between eDNA studies. Other factors should be investigated with chemically treated sediment such other metal ions (lead, zinc, arsenic, aluminium, etc.) and other organic compounds (fulvic acid, tannic acid, etc.) which could also affect DNA detectability.

Our methodological approach also had downsides. Chemically treated sediments are not representative of natural samples (Geraldi *et al.*, 2020). The chemical treatment of sediment to remove known inhibitors of PCR has modified the natural properties of sediment. Besides, interactions between DNA and a variety of organic/inorganic compounds are likely present and affect in various ways DNA detectability in natural sediments. We also obtained low DNA detection for the reference state (6.3 ± 1.0 %). This result could be due to methods used but they could indicate that the chemically treated sediment still contained inorganic compounds. The fact that we used plasmid DNA is also a downside as it does not represent all types of DNA encountered in the environment. However, plasmid DNA has the advantage

to provide highly replicable concentrations of DNA in controlled conditions (i.e., DNA suspended in sterile water, no inhibitor resulting from the DNA extraction from a specimen, DNA degradation at minimum). Next steps in future studies would include the combination of effects of metal ions and humic acids on eDNA detectability and the characterization of their influence in natural matrices (e.g., sediment, water) with eDNA.

Our results for metal ions and humic acids may apply to other environmental matrices. In freshwater environments, metal ion concentrations are generally lower than in seawater environments. However, higher metal ion concentrations may occur in areas with anthropogenic activities (e.g., mine tailing, production of metal-based compound). For humic acids, freshwater environments such as lake and ponds are more likely to contain higher concentrations of organic matter, thus humic acid, due to the surrounding vegetation (Harper *et al.*, 2019). However, terrestrial humic acids are composed of dissimilar functional groups and element composition compared to those from marine sources. Therefore, they might affect the DNA detectability differently.

Our results also suggested that characterization of metal ions content in sediments can help to interpret eDNA detection results. It may even be essential for sediments from areas with high anthropogenic activities. Metal ions could be assessed by the extraction and characterization of total or labile metal ions affecting all or the extraction and detection stages, respectively. Other proxies such as distance from the continent could also be informative about the presence of terrigenous sediments coming from the land with higher sand and clay content, but also composed of organic matter and influenced by anthropogenic activities (Townsend, 2012).

Most importantly, our study identified compounds that could improve eDNA detections. Copper and EDTA both increased DNA detectability. Nkuna *et al.* (2022) recommended preliminary studies to determine if the addition of EDTA prior to DNA extraction of metal contaminate area could help increase the DNA recovery. Such an approach may be beneficial for any environmental matrix.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Cloé Lepage, Jade Larivière, Ariane Therien, Audrey Bourret, Grégoire Cortial, and Éric Parent from the Laboratory of Genomics at Maurice Lamontagne Institute, Marie-Eve Anglehart and Steeven Ouellet from the Université du Québec à Rimouski for their technical support and advice. We also want to thank David Simard, Coralie Lebreux, and Gabriel Côté for their technical support with sampling and sediments chemical treatments. Part of this study was supported by Québec-Océan and by the *Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies* (FRQNT) MSc scholarship provided to Laury-Ann Dumoulin.

6. SUPPLEMENTARY MATERIAL

6.1 Appendix 1

Table 4. Concentrations of compound added to sediment aliquots. The artificial seawater contained calcium ($110 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) but none of the other compounds.

	Calcium (mg kg^{-1})	Copper (mg kg^{-1})	Iron (mg kg^{-1})	Manganese (mg kg^{-1})	Humic acids (mg kg^{-1})	EDTA (mg kg^{-1})
Seawater	110	0	0	0	0	0
Concentration 1	115	4	40	4	20	4,000
Concentration 2	130	20	400	20	40	6,000
Concentration 3	150	40	2,000	40	80	8,000
Concentration 4	320	80	4,000	200	400	10,000
Concentration 5	530	200	10,000	400	2,000	12,000
Concentration 6	4,270	300	20,000	4,000	4,000	16,000
Concentration 7	20,890	400	30,000	20,000	10,000	20,000
Concentration 8	-	-	-	-	-	24,000
Concentration 9	-	-	-	-	-	29,200

6.2 Appendix 2

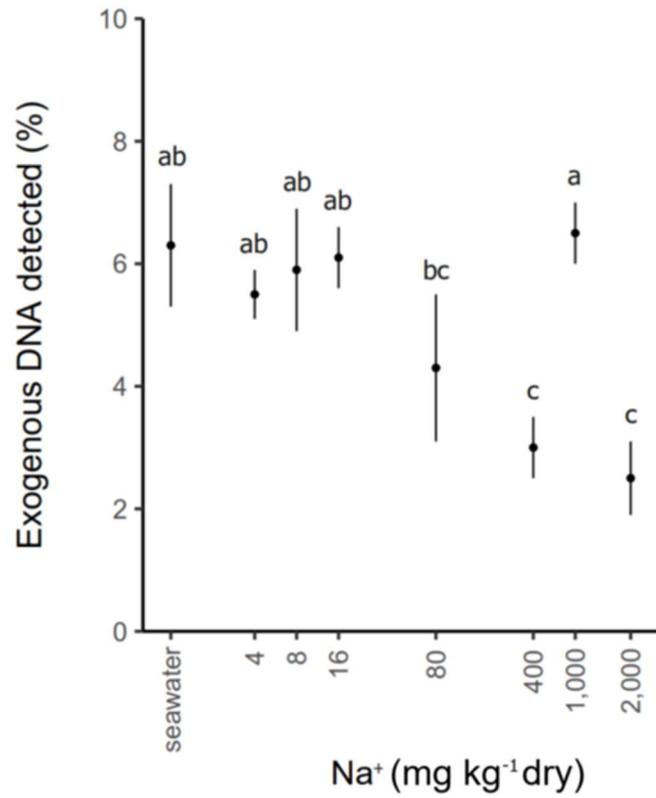


Figure 16. Effect of sodium concentrations on the DNA detectability. The mean and standard error are presented. Letters indicate differences according to $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis nonparametric test followed by a post hoc Dunn test).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le projet de recherche présenté dans ce mémoire s'est intéressé à l'un des principaux défis des approches dans le domaine émergent de la détection d'ADNe. Par les expériences menées, il a été possible d'évaluer l'influence de la granulométrie, de la concentration en ions métalliques et en acides humiques sur la détectabilité de l'ADNe, et ce, dans une matrice sédimentaire traitée. Cette recherche se démarque des autres publications dans le domaine d'une part, par l'ajout des composés étudiés directement dans la matrice c'est-à-dire préalablement à la lyse et à l'extraction de l'ADN et, d'autre part, par l'utilisation d'une matrice traitée afin d'évaluer l'influence de facteurs individuellement. En effet, la plupart des études publiées concernant les inhibiteurs évaluent l'influence de ces derniers directement dans la solution PCR alors que cette méthode, bien que permettant d'évaluer le potentiel inhibiteur à cette étape, n'est pas représentative des conditions réelles auxquelles sont soumis les échantillons environnementaux. Le traitement d'un échantillon environnemental pour la détection d'ADNe fait généralement intervenir une étape de retrait des inhibiteurs en plus des étapes de lyse et d'extraction d'ADN qui sont susceptibles d'entraîner une réduction de la présence de ces composés dans l'extrait. Ainsi, la présente étude avait pour but de simuler le traitement réel d'un échantillon tout en évaluant l'influence des facteurs ciblés par leur modification dans le cas de la granulométrie ou leur ajout en ce qui concerne les acides humiques et les ions métalliques directement dans une matrice sédimentaire pour permettre de mieux comprendre et d'optimiser la détectabilité de l'ADNe, ce qui n'avait pas été réalisé auparavant.

Le premier chapitre fait état du traitement de sédiments par extractions chimiques ciblés visant à retirer les principaux inhibiteurs connus mis sur pied pour la réalisation de ce projet de recherche. Afin de bien caractériser l'effet de chacun des facteurs à l'étude, les sédiments utilisés ont été traités chimiquement afin de retirer les ions métalliques, les substances humiques (acides humiques et acides fulviques) ainsi que les composés phénoliques. Le développement de cette méthode a permis l'obtention d'une matrice sédimentaire de référence relativement exempte d'inhibiteurs connus pour mieux

comprendre l'impact des composés ajoutés. Le développement de cette procédure de traitement chimiques des sédiments s'avérerait nécessaire compte tenu du fait qu'il n'existe aucun matériel de référence certifié à ce jour pour l'analyse d'ADNe.

Le second chapitre présente sous forme d'article scientifique des expériences menées sur l'effet des facteurs étudiés quant à la détectabilité de l'ADNe dans une matrice sédimentaire traitée. Il présente entre autres le contexte de la recherche, la méthodologie ainsi que les résultats et les conclusions qu'il est possible d'en tirer. Au cours des expériences menées, certains facteurs ont permis d'améliorer la détectabilité de l'ADN. L'augmentation de la proportion de limon a entraîné l'augmentation de la détectabilité de l'ADN. La présence d'ions métalliques de cuivre ainsi que celle d'acides humiques a également entraîné une augmentation de la détectabilité de l'ADN dans la matrice sédimentaire composée à 30 % de limon. Ce résultat est particulièrement surprenant pour les acides humiques dont l'identification à titre d'inhibiteur est largement répandue dans la littérature quant à son effet sur la PCR. L'hypothèse soulevée que les acides humiques pourraient chélater certains inhibiteurs toujours présents dans la matrice sédimentaire traitée est appuyée par l'effet de l'ajout d'EDTA entraînant l'augmentation de la détectabilité de l'ADN. Le calcium, le fer et le manganèse ont entraîné une réduction de la détectabilité de l'ADN jusqu'à l'absence de détection alors que certaines concentrations testées sont naturellement retrouvées dans les sédiments marins de surface. L'effet d'inhibition du calcium et du fer avait été identifié en PCR alors que le présent mémoire identifie également qu'ils tendent, dans l'environnement, à réduire la détectabilité de l'ADN. Pour le manganèse, il s'agit de la première fois qu'il est identifié à titre de facteurs pouvant limiter la détectabilité de l'ADN dans l'environnement alors que son effet sur la PCR n'a toujours pas été étudié. Cette réduction de la capacité de détection de matériel génétique à des concentrations naturelles d'ions métalliques pourrait s'avérer une problématique importante pour la mise en place d'activité de monitoring à l'aide d'ADNe en milieu marin. Toutefois, l'EDTA pourrait permettre d'améliorer la capacité de détection de l'ADNe considérant qu'il s'agit d'un chélatant reconnu pour son affinité avec les ions métalliques.

Limites et travaux futurs

Une caractérisation de la matrice sédimentaire traitée plus détaillée que l'analyse de la composition minérale pourrait être réalisée afin de permettre une meilleure compréhension des expériences menées. De plus, cette caractérisation pourrait s'intégrer dans l'objectif de créer une matrice de référence dont la capacité de détection d'ADN est connue alors qu'une telle référence n'est actuellement pas disponible. Une caractérisation plus complète pourrait entre autres inclure la composition élémentaire ainsi que l'analyse des métaux faiblement liés et de la matière organique afin d'évaluer l'efficacité du traitement chimique réalisé, puis l'analyse des métaux totaux ce qui permettrait d'évaluer la présence de métaux pouvant potentiellement créer des liens avec le matériel génétique et réduire sa capacité de récupération lors de la procédure d'extraction.

À titre de limite pour l'étude menée, l'utilisation d'ADN plasmidique pourrait être affectée différemment des formes variées d'ADNe retrouvées dans l'environnement. Étant de l'ADN libre, l'ADN plasmidique pourrait s'avérer plus sensible que les formes d'ADN retrouvées dans l'environnement. Toutefois, l'utilisation d'un plasmide permettait l'ajout d'une quantité d'ADN exogène connue et dont l'intégrité était assurée contrairement à de l'ADN extrait d'un spécimen. En ce sens, il pourrait s'avérer pertinent de réaliser des expériences sur l'effet de facteurs sur la détectabilité de l'ADN en mésocosme constituée d'une matrice sédimentaire et d'eau salée de composition connue en ajoutant les composés à l'étude dans un système en milieu fermé après le retrait d'un ou de plusieurs individus d'une espèce d'intérêt pour caractériser l'effet de facteurs sur la détectabilité d'ADNe en milieu semi-contrôlé. En ce qui concerne l'effet des acides humiques, il est à noter que les acides humiques utilisés sont commerciaux et n'ont pas été caractérisés, ainsi il est impossible de savoir s'ils proviennent de milieu marin ou de milieu terrestre. Cette différence pourrait être marquée par leur composition et leurs groupements fonctionnels pouvant intervenir en ce qui concerne leur effet sur la détectabilité de l'ADNe. Lors du traitement des sédiments par extractions chimiques ciblées, les acides humiques extraits auraient pu être purifiés,

caractérisés et quantifiés de manière à les réintroduire dans la matrice en concentration connue ce qui n'a pas pu être réalisé en raison de contrainte de temps et d'équipement.

La réalisation de ce projet de recherche met en lumière d'autres questions notamment en ce qui concerne le développement d'une approche standardisée visant l'optimisation des détections en ADNe et l'effet de la combinaison de facteurs sur la détectabilité de l'ADNe. Plus spécifiquement, l'ajout d'EDTA, s'avérant être un facteur améliorant la détectabilité de l'ADN dans les sédiments marins, pourrait être investigué pour caractériser son effet dans l'eau. De plus, le développement et la caractérisation d'une matrice de référence pour l'ADNe pourraient être mis sur pied. Plus d'études pourraient être réalisées quant à la présence et à la combinaison de facteurs pouvant influencer la détectabilité de l'ADN dans l'environnement notamment en ce qui concerne les processus géochimiques impliquant les oxydes de fer et de manganèse. Il pourrait également être pertinent d'ajouter un contrôle positif interne préalablement à la détection par qPCR pour identifier la présence d'inhibition lors de cette étape considérant que le rendement de l'ADN ajouté en début d'extraction ne permet pas de distinguer l'efficacité de l'extraction de celle de la détection. Finalement, la caractérisation de la matrice d'un échantillon pourrait être réalisée préalablement à la détection d'ADNe afin d'éviter de traiter des échantillons contenant une trop forte concentration d'inhibiteurs dont le résultat ne pourrait distinguer l'absence de l'espèce à un faux négatif.

ANNEXE I

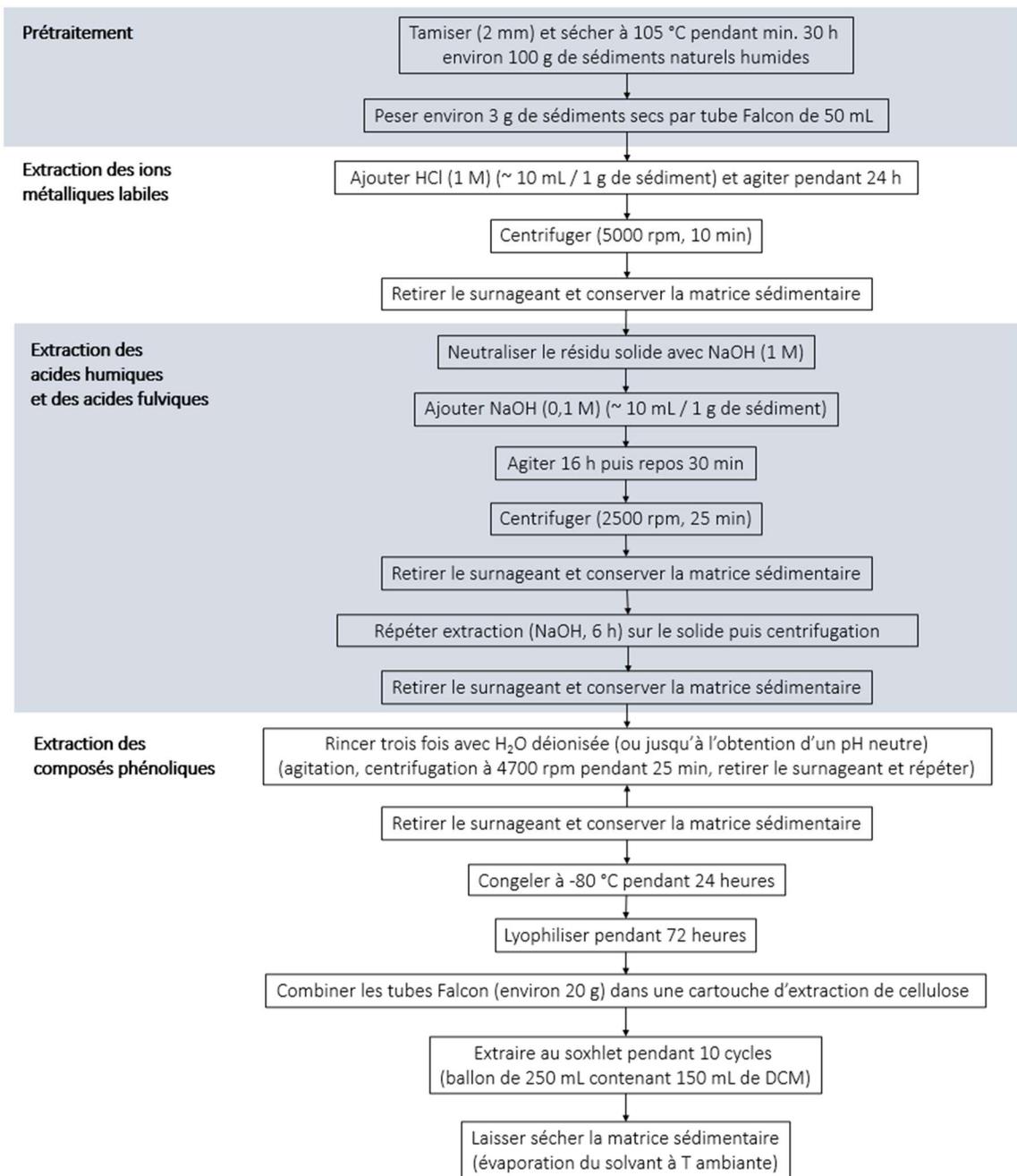


Figure 17. Procédure détaillée du traitement chimique effectuer sur des sédiments par une séquence d'extractions ciblées

ANNEXE 2

Tableau 5. Concentrations en ions métalliques des sédiments naturels extraits à l'acide chlorhydrique 1M et analysés au MP-AES.

Concentrations en ions métalliques (mg kg⁻¹ sec)	Anse à Wilson		Baie des Cochons	
	Moyenne	± écart-type	Moyenne	± écart-type
Calcium	3,0·10 ³	± 0,2·10 ³	4,0·10 ³	± 0,1·10 ³
Cuivre	< LD	< LD	11,995	± 0,003
Fer	6,0·10 ³	± 0,2·10 ³	1,04·10 ⁴	± 0,04·10 ⁴
Manganèse	148	± 3	4,0·10 ²	± 0,6·10 ²

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, C., Coulson, M., Gagné, N., Lacoursière-Roussel, A., Parent, G. J., Bajno, R., ... & 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*. Ottawa, ON, Canada: Canadian Science Advisory Secretariat (CSAS).
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current research in food science*, 4, 200–214.
- American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation. (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (23rd ed.). American Public Health Association. 1504 p.
- Aminot et Chaussepied. (1983). *Manuel des analyses chimiques en milieu marin*. Centre National pour l'Exploitation des Océans. Editions Jouve, CNEXO, Paris. 395 p.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 5, 209–219.
- Baillie, S. M., McGowan, C., May-McNally, S., Leggatt, R., Sutherland, B. J., & 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 + 84 p.
- Barba, F. J., Grimi, N., & Vorobiev, E. (2015). New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. *Food Engineering Reviews*, 7, 45-62.
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2014). Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science and Technology*, 48, 1819-1827.
- Beng, K. C., & Corlett, R. T. (2020). Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation*, 29, 2089-2121.
- Bio-Rad Laboratories (Bio-Rad). 2020. Optimizing Real Time qPCR, A Focused for Exceptional Real Time qPCR Results. [Atelier virtuel] par Claude Lachance (Bio-Rad Laboratories).
- Black, J. G. (1996). *Microbiology: Principles and applications*. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey, 790 p.

- Blossom, N.W. (2001). Copper in the Ocean Environment, 8 p.
- Boyd, P. W., & Ellwood, M. J. (2010). The biogeochemical cycle of iron in the ocean. *Nature Geoscience*, 3, 675–682.
- Bruce, K., Blackman, R. C., Bourlat, S. J., Hellström, M., Bakker, J., Bista, I., ... & Deiner, K. (2021). A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment. Pensoft, Sofia, Bulgaria, 95 p.
- Burian, A., Mauvisseau, Q., Bulling, M., Domisch, S., Qian, S., & Sweet, M. (2021). Improving the reliability of eDNA data interpretation. *Molecular Ecology Resources*, 21, 1422–1433.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611–622.
- Butler B. & Hillier S. (2021). powdR: An R package for quantitative mineralogy using full pattern summation of X-ray powder diffraction data. *Computers & Geosciences* 147, 1–12.
- Buxton AS, Groombridge JJ & Griffiths RA (2017) Is the detection of aquatic environmental DNA influenced by substrate type? *PLoS ONE*, 12, 1–14.
- Buxton, A. S., Groombridge, J. J., & Griffiths, R. A. (2018). Seasonal variation in environmental DNA detection in sediment and water samples. *PLoS ONE*, 13, 1–14.
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ). (2009). Lignes directrices concernant les travaux analytiques en chimie, DR-12-SCA-01. Édition courante, 1–26.
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ). (2012). Terminologie recommandée pour l'analyse des métaux, 4e éd., Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec. 15 p.
- Chevrin, M., Demers, A., Dumoulin, L.-A., Gagné, N., Larivière, J., LeBlanc, F., Simard, N., Therien, A., Weise, A. M., and Parent, G. J. 2023. Targeted detection of European green crab (*Carcinus maenas*) and Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) using environmental DNA. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 3237 : vii + 32 p.
- Chial, H. & Craig, J. (2008) mtDNA and mitochondrial diseases. *Nature Education* 1: 217

- Collins, R. A., Wangensteen, O. S., O’Gorman, E. J., Mariani, S., Sims, D. W., & Genner, M. J. (2018). Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology*, *1*, 1-11.
- Combs, L. G., Warren, J. E., Huynh, V., Castaneda, J., Golden, T. D., & Roby, R. K. (2015). The effects of metal ion PCR inhibitors on results obtained with the Quantifiler® Human DNA Quantification Kit. *Forensic Science International: Genetics*, *19*, 180-189.
- Corinaldesi, C., Beolchini, F., & Dell’Anno, A. (2008). Damage and degradation rates of extracellular DNA in marine sediments: implications for the preservation of gene sequences. *Molecular Ecology*, *17*, 3939-3951.
- Crossey, L. J. (2003). Humic substances in sediments. Dans G. V Middleton, M. J. Church, M. Coniglio, L. A. Hardie, & F. J. Longstaffe (Éds.), *Encyclopedia of Sediments and Sedimentary Rocks* (p. 361-362). Springer Netherlands.
- De Brauwier M, Chariton A, Clarke LJ, Cooper MK, DiBattista J, Furlan E, Giblot-Ducray D, Gleeson D, Harford A, Herbert S, MacDonald AJ, Miller A, Montgomery K, Mooney T, Noble LM, Rourke M, Sherman CDH, Stat M, Suter L, West KM, White N, Villacorta-Rath C, Zaiko A & Trujillo-Gonzalez A (2022). Environmental DNA protocol development guide for biomonitoring. National eDNA Reference Centre, Canberra. 49 p.
- De Brauwier M, Chariton A, Clarke LJ, Cooper MK, DiBattista J, Furlan E, Giblot-Ducray D, Gleeson D, Harford A, Herbert S, MacDonald AJ, Miller A, Montgomery K, Mooney T, Noble LM, Rourke M, Sherman CDH, Stat M, Suter L, West KM, White N, Villacorta-Rath C, Zaiko A & Trujillo-Gonzalez A (2022). Environmental DNA test validation guidelines. National eDNA Reference Centre, Canberra. 33 p.
- Deiner, K., Lopez, J., Bourne, S., Holman, L. E., Seymour, M., Grey, E. K., ... & Lodge, D. M. (2018). Optimising the detection of marine taxonomic richness using environmental DNA metabarcoding: the effects of filter material, pore size and extraction method. *Metabarcoding and Metagenomics*, *2*, 1-29.
- DNAqua-Net. DNAqua-Net. Aquatic Ecosystem Research, University of Duisburg-Essen. <https://dnaqua.net/>
- Eberl, D. D. (2003). User guide to RockJock—A program for determining quantitative mineralogy from X-ray diffraction data. USGS Open File Report, OF 03-78, 40. Guide: <https://pubs.usgs.gov/of/2003/of03-078/>
- Eisenhauer, A. (2011). Divalent Earth Alkaline Cations in Seawater. In: Reitner, J., Thiel, V. (eds) *Encyclopedia of Geobiology*. Encyclopedia of Earth Sciences Series. Springer, Dordrecht.

- Environnement Canada et ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2007. Critères pour l'évaluation de la qualité des sédiments au Québec et cadres d'application : prévention, dragage et restauration. 39 pages.
- PourFarell, E. M., & Alexandre, G. (2012). Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC research notes*, 5, 1-8.
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters*, 4, 423-425.
- Ficetola, G. F., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Giguët-Covex, C., De Barba, M., ... & Taberlet, P. (2015). Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Molecular ecology resources*, 15, 543-556.
- Furlan, E. M., & Gleeson, D. (2016). Improving reliability in environmental DNA detection surveys through enhanced quality control. *Marine and Freshwater Research*, 68, 388-395.
- Geraldi, N. R., Díaz-Rúa, R., Shea, L. A., & Duarte, C. M. (2020). Performance of extraction methods for extracellular DNA from sediments across marine habitats. *Environmental DNA*, 2, 91-98.
- Gledhill, M., & Buck, K. N. (2012). The organic complexation of iron in the marine environment: a review. *Frontiers in microbiology*, 3, 69.
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., ... & Taberlet, P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in ecology and evolution*, 7, 1299-1307.
- Goldberg, M. C., & Weiner, E. R. (1980). Extraction and concentration of phenolic compounds from water and sediment. *Analytica Chimica Acta*, 115, 373-378.
- Griffiths, A. J. F., Carroll, S. B., Wessler, S., & Lewontin, R. C. (2010). *Introduction à l'analyse génétique*. De Boeck Supérieur. Paris, 856 p.
- Harper, L. R., Buxton, A. S., Rees, H. C., Bruce, K., Brys, R., Halfmaerten, D., ... & Hänfling, B. (2019). Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia*, 826, 25-41.
- Harrison, J. B., Sunday, J. M., & Rogers, S. M. (2019). Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B*, 286, 20191409.

- He, X., Sutherland, T. F., & Abbott, C. L. (2021). Improved efficiency in eDNA metabarcoding of benthic metazoans by sieving sediments prior to DNA extraction. *Environmental DNA*, 3, 716-726.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, 313-321.
- Helbing, C. C., & Hobbs, J. (2019). Environmental DNA standardization needs for fish and wildlife population assessments and monitoring. *Canadian Standards Association*, 1-41.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 7276-7280.
- Hunter, M. E., Ferrante, J. A., Meigs-Friend, G., & Ulmer, A. (2019). Improving eDNA yield and inhibitor reduction through increased water volumes and multi-filter isolation techniques. *Scientific Reports*, 9, 1-9.
- International Humic Substances Society (IHSS). 2020. [En ligne] *IHSS Samples*. URL : <https://humic-substances.org/>
- Ivanova, N. V., Zemplak, T. S., Hanner, R. H., & Hebert, P. D. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7, 544-548.
- Jane, S. F., Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Schwartz, M. K., Lowe, W. H., ... & Whiteley, A. R. (2015). Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular ecology resources*, 15, 216-227.
- Joseph, A., & Joseph, A. (2017). Chapter 2 - Secrets of Bermuda Triangle and Formation of Polymetallic Nodules In *Investigating Seafloors and Oceans* (pp.81-138), ELSEVIER.
- Kanbar, H. J., Olajos, F., Englund, G., & Holmboe, M. (2020). Geochemical identification of potential DNA-hotspots and DNA-infrared fingerprints in lake sediments. *Applied Geochemistry*, 122, 1-11.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., & Khorana, H. G. (1971). Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of molecular biology*, 56, 341-361.

- Klymus, K. E., Merkes, C. M., Allison, M. J., Goldberg, C. S., Helbing, C. C., Hunter, M. E., ... & Richter, C. A. (2020). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*, 2, 271-282.
- Kuffel, A., Gray, A., & Daeid, N. N. (2021). Impact of metal ions on PCR inhibition and RT-PCR efficiency. *International Journal of Legal Medicine*, 135, 63-72.
- Kumar, G., Eble, J. E., & Gaither, M. R. (2020). A practical guide to sample preservation and pre-PCR processing of aquatic environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 20, 29-39.
- Kuwae, M., Tamai, H., Sakata, M. K., Minamoto, T., & Suzuki, Y. (2020). Sedimentary DNA tracks decadal-centennial changes in fish abundance. *Communications biology*, 3, 1-12.
- Lacoursière-Roussel, A., & Deiner, K. (2021). Environmental DNA is not the tool by itself. *Journal of Fish Biology*, 98, 383-386.
- Lacoursière-Roussel, A., Rosabal, M., & Bernatchez, L. (2016). Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular Ecology Resources*, 16, 1401-1414.
- LaMotte Company. (2022). Soil Texture Kit. 4 p.
- Lance, R. F., & Guan, X. (2020). Variation in inhibitor effects on qPCR assays and implications for eDNA surveys. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 77, 23-33.
- Lear, G., Dickie, I., Banks, J., Boyer, S., Buckley, H. L., Buckley, T. R., ... & Holdaway, R. (2018). Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples. *New Zealand Journal of Ecology*, 42, 10-50A.
- LeBlanc, F., Belliveau, V., Watson, E., Coomber, C., Simard, N., & Dibacco, C. (2020). Environmental DNA (eDNA) detection of marine aquatic invasive species (AIS) in Eastern Canada using a targeted species-specific qPCR approach. *Management of Biological Invasions*, 11, 201217
- Lekang, K., Thompson, E. M., & Troedsson, C. (2015). A comparison of DNA extraction methods for biodiversity studies of eukaryotes in marine sediments. *Aquatic microbial ecology*, 75, 15-25.

- Lesperance, M. L., Allison, M. J., Bergman, L. C., Hocking, M. D., & Helbing, C. C. (2021). A statistical model for calibration and computation of detection and quantification limits for low copy number environmental DNA samples. *Environmental DNA*, 3, 970-981.
- Lever, M. A., Torti, A., Eickenbusch, P., Michaud, A. B., Šantl-Temkiv, T., & Jørgensen, B. B. (2015). A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-22.
- Levy-Booth, D. J., Campbell, R. G., Gulden, R. H., Hart, M. M., Powell, J. R., Klironomos, J. N., ... & Dunfield, K. E. (2007). Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 2977-2991.
- Loeza-Quintana, T., Abbott, C. L., Heath, D. D., Bernatchez, L., & Hanner, R. H. (2020). Pathway to Increase Standards and Competency of eDNA Surveys (PISCeS)—Advancing collaboration and standardization efforts in the field of eDNA. *Environmental DNA*, 2, 255-260.
- Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical microbiology and infection*, 10, 190-212.
- Matheson, C. D., Gurney, C., Esau, N., & Lehto, R. (2010). Assessing PCR inhibition from humic substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, 3, 38-45.
- Millero, F.J. (2002). Sea Water as an Electrolyte. In: Gianguzza, A., Pelizzetti, E., Sammartano, S. (eds) Chemistry of Marine Water and Sediments. *Environmental Science*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- MilliporeSigma. (2013). [En ligne] *PCR Master Mix*. URL : <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/pcr-master-mix>
- MilliporeSigma. (s. d.). [En ligne] *FastStart Taq DNA Polymerase*. URL : <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/product/roche/ftaqro>
- Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques et Environnement et Changement climatique Canada, (MDDELCC-ECC). (2016). Guide de caractérisation physico-chimique et toxicologique des sédiments. 62 pages + annexes.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986, January). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 51, pp. 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Murnyak, G., Vandenberg, J., Yaroschak, P. J., Williams, L., Prabhakaran, K., & Hinz, J. (2011). Emerging contaminants: presentations at the 2009 Toxicology and Risk Assessment Conference. *Toxicology and applied pharmacology*, 254, 167-169.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. J. C. C. A. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta*, 439, 231-250.
- Nelson-Chorney, H. T., Davis, C. S., Poesch, M. S., Vinebrooke, R. D., Carli, C. M., & Taylor, M. K. (2019). Environmental DNA in lake sediment reveals biogeography of native genetic diversity. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 17, 313-318.
- Nevers, M. B., Przybyla-Kelly, K., Shively, D., Morris, C. C., Dickey, J., & Byappanahalli, M. N. (2020). Influence of sediment and stream transport on detecting a source of environmental DNA. *PLoS One*, 15, 1-21.
- Nielsen, K. M., Johnsen, P. J., Bensasson, D., & Daffonchio, D. (2007). Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental biosafety research*, 6, 37-53.
- Nkuna, R., Ijoma, G. N., & Matambo, T. S. (2022). Applying EDTA in Chelating Excess Metal Ions to Improve Downstream DNA Recovery from Mine Tailings for Long-Read Amplicon Sequencing of Acidophilic Fungi Communities. *Journal of Fungi*, 8, 419.
- Ogram, A., Sayler, G. S., & Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of microbiological methods*, 7, 57-66.
- Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Mächler, E., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA applications in biomonitoring and bioassessment of aquatic ecosystems. *Environmental Studies*, 2010, 1-71.
- Pawlowski, J., Bruce, K., Panksep, K., Aguirre, F. I., Amalfitano, S., Apothéloz-Perret-Gentil, L., ... & Fazi, S. (2021). Environmental DNA metabarcoding for benthic monitoring: A review of sediment sampling and DNA extraction methods. *Science of the Total Environment*, 818, 1-17.
- PCR detection of microbial pathogens*. PCR detection of microbial pathogens. (2013). M. Wilks (2nd ed.). Humana Press, London, United Kingdom, Springer. 319 p.
- Pearman, J. K., Keeley, N. B., Wood, S. A., Laroche, O., Zaiko, A., Thomson-Laing, G., Biessy, L., Atalah, J., & Pochon, X. (2020). Comparing sediment DNA extraction methods for assessing organic enrichment associated with marine aquaculture. *PeerJ*, 8, 1-22.

- Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M. T., Guerri, G., & Nannipieri, P. (2009). Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45, 219-235.
- Pinsino, A., Matranga, V., & Roccheri, M. C. (2012). 2. Manganese: a new emerging contaminant in the environment. In *Environmental contamination*, 17-36.
- Polyanichko, A. M., Andrushchenko, V. V., Chikhirzhina, E. V., Vorob'ev, V. I., & Wieser, H. (2004). The effect of manganese (II) on DNA structure: Electronic and vibrational circular dichroism studies. *Nucleic Acids Research*, 32, 989-996.
- QIAGEN. (2020). DNeasy® PowerLyzer® PowerSoil® Kit Handbook. 20 p.
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reece, J. B., & Campbell, N. A. (2012). *Campbell biology*. Boston: Benjamin Cummings. Pearson, 1458 p.
- Roux, L. D., Giblot-Ducray, D., Bott, N. J., Wiltshire, K. H., Deveney, M. R., Westfall, K. M., & Abbott, C. L. (2020). Analytical validation and field testing of a specific qPCR assay for environmental DNA detection of invasive European green crab (*Carcinus maenas*). *Environmental DNA*, 1, 309-320.
- Sakata, M. K., Yamamoto, S., Gotoh, R. O., Miya, M., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2020). Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA. *Environmental DNA*, 2, 505-518.
- Sales, N. G., Wangenstein, O. S., Carvalho, D. C., & Mariani, S. (2019). Influence of preservation methods, sample medium and sampling time on eDNA recovery in a neotropical river. *Environmental DNA*, 1, 119-130.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York. 2344 p.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 1014-1026.
- Sepulveda, A. J., Nelson, N. M., Jerde, C. L., & Luikart, G. (2020). Are environmental DNA methods ready for aquatic invasive species management?. *Trends in ecology & evolution*, 35, 668-678.

- Shu, L., Ludwig, A., & Peng, Z. (2020). Standards for methods utilizing environmental dna for detection of fish species. *Genes*, 11, 1-14.
- Sidstedt, M., Rådström, P., & Hedman, J. (2020). PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 1-15.
- Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, F. J. (1997). *Fundamentals of analytical chemistry* (7th ed.). De Boeck & Larcier, Paris, Bruxelles, 996 p.
- Snape, I., Scouller, R. C., Stark, S. C., Stark, J., Riddle, M. J., & Gore, D. B. (2004). Characterisation of the dilute HCl extraction method for the identification of metal contamination in Antarctic marine sediments. *Chemosphere*, 57, 491-504.
- Stoeckle, B. C., Beggel, S., Cerwenka, A. F., Motivans, E., Kuehn, R., & Geist, J. (2017). A systematic approach to evaluate the influence of environmental conditions on eDNA detection success in aquatic ecosystems. *PLoS ONE*, 12, 1-16.
- Street, J. H., & Paytan, A. (2005). Iron, phytoplankton growth, and the carbon cycle. *Metal ions in biological systems*, 43, 153-193.
- Strickler, K. M., Fremier, A. K., & Goldberg, C. S. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85-92.
- Sutlović, D., Gojanović, M. D., Anđelinović, Š., Gugić, D., & Primorac, D. (2005). Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. *Croatian Medical Journal*, 46, 556-562.
- Swift, R.S. (1996). Organic Matter Characterization. Dans D. Sparks, A. Page, P. Helmke, R. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnston and M.E. Sumner), *Methods of Soil Analysis* (p. 1011-1069).
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular ecology*, 21, 1789-1793.
- Thalinger, B., Deiner, K., Harper, L. R., Rees, H. C., Blackman, R. C., Sint, D., Traugott, M., Goldberg, C. S., & Bruce, K. (2021). A validation scale to determine the readiness of environmental DNA assays for routine species monitoring. *Environmental DNA*, 3, 823-836.
- ThermoFisher Scientific, (2020). [En ligne] *TaqMan™ MGB Probe* URL : <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4316034>

- ThermoFisher Scientific. (s. d.) a. [En ligne] *PCR Master Mix (2X)*. URL : <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0171>
- ThermoFisher Scientific. (s. d.) b. [En ligne] *PCR Basics*. URL : <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>
- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 418.
- Torti, A., Lever, M. A., & Jørgensen, B. B. (2015). Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments. *Marine Genomics*, 24, 185-196.
- Townsend, D. W. (2012). *Oceanography and marine biology: an introduction to marine science*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 512 p.
- Tremblay, L. (2003) Contributions géochimique et analytique à l'étude des substances humiques du système marin du Saint- Laurent. [Thèse de doctorat]. Université du Québec à Rimouski.
- Tremblay, L., & Gagné, J. P. (2007). Distribution and biogeochemistry of sedimentary humic substances in the St. Lawrence Estuary and the Saguenay Fjord, Québec. *Organic Geochemistry*, 38, 682-699.
- Tremblay, L., & Gagné, J. P. (2009). Organic matter distribution and reactivity in the waters of a large estuarine system. *Marine Chemistry*, 116, 1-12.
- Tsuji, S., Takahara, T., Doi, H., Shibata, N., & Yamanaka, H. (2019). The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1, 99-108.
- Turner, C. R., Uy, K. L., & Everhart, R. C. (2015). Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*, 183, 93-102.
- Uchii, K., Doi, H., Okahashi, T., Katano, I., Yamanaka, H., Sakata, M. K., & Minamoto, T. (2019). Comparison of inhibition resistance among PCR reagents for detection and quantification of environmental DNA. *Environmental DNA*, 4, 359-367
- Varela-Ramirez, A., Abendroth, J., Mejia, A. A., Phan, I. Q., Lorimer, D. D., Edwards, T. E., & Aguilera, R. J. (2017). Structure of acid deoxyribonuclease. *Nucleic Acids Research*, 45, 6217-6227.

Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3741-3751.

Zulkefli, N. S., Kim, K.-H., & Hwang, S.-J. (2019). Effects of Microbial Activity and Environmental Parameters on the Degradation of Extracellular Environmental DNA from a Eutrophic Lake. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 1-15.

ZymoResearch. (s.d.). OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit.

