

INRS – Institut Armand – Frappier

Différenciation des sources de pollutions fécales humaines et animales dans
l'eau: utilisation de marqueurs géniques

Par

Anouk Martellini

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

François Shareck, INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Roland Brousseau,
Secteur environnement,
Institut de Recherche en Biotechnologie

Directeur de recherche

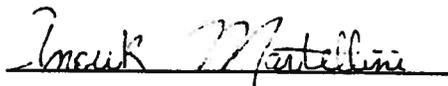
Richard Villemur, INRS-Institut Armand-Frappier

Codirecteur de recherche

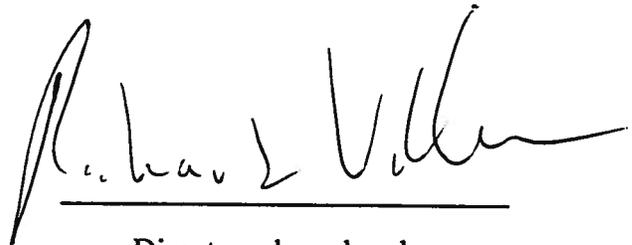
Pierre Payment, INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

L'objectif de ce projet de recherche était de développer une nouvelle méthode moléculaire capable d'identifier les sources de pollutions fécales humaines et animales dans l'eau. Contrairement aux nombreuses approches déjà testées qui visent toutes des microorganismes, la méthode proposée ici cible le matériel génétique des cellules humaines et animales excrétées dans les fèces, d'où son côté innovateur. Pour ce faire, un protocole d'amplification a été élaboré avec des amorces conçues pour cibler spécifiquement l'ADN mitochondrial et l'ADN ribosomal 28S de l'humain et de divers animaux (moutons, bœufs et porcs). Une méthode d'extraction a été mise au point et les conditions des réactions de PCR, de PCR multiplex et de PCR internes ont été établies avec des ADN extraits de tissus et de fèces. L'approche faisant appel à l'ADN ribosomal 28S, n'étant pas pratique, a dû être abandonnée. Les amorces mitochondriales ont ensuite été testées avec les ADN extraits d'eaux usées provenant de la station d'épuration de Fabreville, d'eaux provenant de deux fermes, de lisier de porc (avant et après traitement dans un bioréacteur thermophile), et d'eaux provenant de la rivière l'Assomption et de la rivière des Mille-Îles. Au moins une des 4 espèces a été détectée dans la plupart des échantillons. De plus, il a été démontré que les marqueurs pouvaient persister au moins 5 jours dans l'eau usée. Il a également été démontré que le PCR interne est capable de détecter l'ADN mitochondrial jusqu'à 0,1 pg d'ADN génomique et que 10^3 à 10^4 cellules humaines par litre d'eau usée peuvent être détectées en utilisant le protocole de PCR multiplex. En conclusion, cette méthode est innovatrice, simple, rapide et fiable pour identifier la source de la contamination fécale dans l'eau.



Étudiante



Directeur de recherche

Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, Richard Villemur, ainsi que mon co-directeur, Pierre Payment, qui m'ont fait confiance pour mener à bien ce projet de maîtrise. Je voudrais également remercier tous les membres du groupe en environnement de l'Institut Armand-Frappier qui m'ont prodigué maints conseils tout au long de ma maîtrise. Il faut aussi que j'inclue dans mes remerciements le Réseau Canadien de l'Eau, qui a financé en partie cette recherche, Mme Lavoie de la ville de Laval, pour avoir autorisé les échantillonnages à la station d'épuration de Fabreville, les employés de la station, pour leur coopération, ainsi que tous ceux qui m'ont fourni des échantillons. Finalement, je remercie mes parents et Martin pour m'avoir encouragé à poursuivre mes études et m'avoir supporté dans les moments plus difficiles.

Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iii
Liste des tableaux et des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Revue bibliographique.....	3
1.1) Situation de l'eau dans le monde.....	3
1.2) Contamination de l'eau.....	3
1.3) Les contaminants possibles.....	4
1.4) Causes de la contamination.....	6
1.5) Les problèmes reliés à la contamination fécale.....	7
1.5.1) Effets de la contamination fécale sur l'environnement.....	7
1.5.2) Problèmes médicaux reliés à la contamination fécale.....	8
1.5.3) Répercussions économiques de la contamination fécale.....	14
1.6) Règlementations sur la qualité des eaux.....	15
1.7) Traitement de l'eau.....	17
1.7.1) Les stations d'épuration.....	17
1.7.2) Les usines de filtration.....	19
1.8) Détection de la contamination fécale.....	20
1.9) Détermination de la source de la contamination fécale.....	24
1.9.1) Méthodes microbiologiques.....	25
1.9.2) Méthodes biochimiques et chimiques.....	27
1.9.3) Méthodes immunologiques.....	29
1.9.4) Méthodes moléculaires.....	29
1.10) Identification d'espèces dans d'autres domaines.....	32
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	35
2.1) Échantillons.....	35
2.2) Extraction d'ADN.....	35
2.3) Élaboration des amorces.....	38

2.4) L'amplification PCR.....	39
2.5) L'électrophorèse	39
2.6) Digestion enzymatique.....	40
Chapitre 3 : Résultats	41
3.1) Amorces	41
3.2) Concentration de BSA	44
3.3) Température d'hybridation	45
3.4) Validation des produits de PCR.....	46
3.5) Tests de sensibilité	48
3.6) Essais d'amplification de l'ADN provenant de fèces	49
3.7) Essais d'amplification de l'ADN provenant d'eaux usées	52
3.7.1) Résistance des marqueurs aux traitements.....	54
3.7.2) Temps de dégradation des marqueurs.....	55
3.7.3) Nombre minimal de cellules détectables	56
3.8) Essais d'amplification de l'ADN provenant d'eaux de terres agricoles	57
3.9) Application de la méthode	58
3.9.1) Amplification de l'ADN provenant de lisier	58
3.9.2) Amplification de l'ADN provenant d'eau de rivières.....	59
Chapitre 4 : Discussion	61
4.1) Explication du choix de la cible.....	61
4.2) Justification de l'abandon de l'ADNr 28S comme cible	62
4.3) Choix des amorces	63
4.4) BSA dans le PCR	64
4.5) Le multiplex PCR	64
4.6) Explication des tests de sensibilité.....	65
4.7) Amplification de l'ADN mitochondrial de fèces et d'eaux	66
4.8) Description de la station d'épuration de Fabreville	66
4.9) Présence de cellules humaines, de bœuf et de porc dans l'eau usée.....	67
4.10) Détection de l'ADN pendant 5 jours	67
4.11) Choix des rivières	67
4.12) Inhibiteurs et colonne PVPP	68

4.13) Explication des résultats obtenus pour l'analyse des rivières	69
4.14) Comparaison avec d'autres méthodes	70
4.14.1) Fiabilité des résultats.....	70
4.14.1.1) Validité de la classification	70
4.14.1.2) Niveau de résolution	71
4.14.1.3) Sensibilité.....	72
4.14.1.4) Durée de détection	72
4.14.2) Coût et logistique	73
4.14.2.1) Banque de données	73
4.14.2.2) Temps.....	74
4.14.2.3) Coût.....	75
4.15) Limites et qualités de la méthode.....	75
4.16) Perspectives.....	76
Conclusion.....	78
Appendice A: Alignements des séquences ayant conduit au choix des amorces.....	79
Appendice B: Photos de tests de sensibilité.....	93
Appendice C: Schéma de la station d'épuration de Fabreville	99
Appendice D: Cartes de la qualité de l'eau des rivières.....	101
Liste des références	104

Liste des tableaux et des figures

Tableau 1 : Principaux microorganismes et maladies hydriques correspondantes.	9
Tableau 2 : Liste des amorces pour PCR et PCR internes.	41
Figure 1 : Amplifications PCR de l'ADN mitochondrial à partir de l'ADN génomique (10 ng) extrait des 4 espèces animales avec les différentes amorces spécifiques.	43
Figure 2 : Amplifications PCR de l'ADN ribosomal 28S à partir de l'ADN génomique extrait de l'humain, du mouton, du bœuf et du porc.	44
Figure 3 : Multiplex PCR (avec les amorces Humito1, Ovmito1, Bomito1 et Pomito1) en présence de différentes concentrations de BSA.	45
Figure 4 : Multiplex PCR avec des températures d'hybridation différentes.	46
Figure 5 : Digestion enzymatique des produits des PCR exécutés avec les amorces définitives.	47
Tableau 3 : Fragments de restriction obtenus après digestion des produits de PCR.	48
Tableau 4 : Limites de sensibilité des amplifications pour chaque espèce.	49
Figure 6 : Amplification PCR des ADN de fèces.	50
Figure 7 : Optimisation du multiplex PCR d'un mélange d'ADN de fèces.	51
Figure 8 : PCR et multiplex PCR de 400ng d'ADN de fèces humaines.	52
Figure 9 : PCR de l'ADN extrait d'eau usée avec les amorces du 16S bactériens.	53
Figure 10 : PCR et multiplex PCR d'ADN extrait à partir d'eau usée.	54
Figure 11 : Multiplex PCR d'ADN d'eau usée échantillonnée à divers endroits d'une station d'épuration.	55
Figure 12 : Multiplex PCR d'ADN d'eau usée entreposée pendant 20 jours.	56
Figure 13 : Multiplex PCR d'ADN extrait de différentes concentrations de cellules humaines contenues dans 1 litre d'eau usée stérilisée.	57
Figure 14 : PCR et multiplex PCR d'ADN extrait d'eau de la ferme de St-Lambert-de-Lauzon.	58
Figure 15 : Amplification d'ADN provenant de lisier brut (A) et de lisier traité (B).	59
Figure 16 : PCR internes de l'ADN extrait de l'eau de la rivière l'Assomption.	60
Figure 17 : Tests de sensibilité des amplifications d'ADN mitochondrial humain.	94

Figure 18 : Tests de sensibilité des amplifications d'ADN mitochondrial ovin.	95
Figure 19 : Tests de sensibilité des amplifications d'ADN mitochondrial bovin.	96
Figure 20 : Tests de sensibilité des amplifications d'ADN mitochondrial porcin.	97
Figure 21 : Tests de sensibilité des amplifications des ADN mitochondriaux des 4 espèces.....	98
Figure 22: Traitements par lesquels l'eau usée de la station d'épuration de Fabreville passe avant d'être rejetée dans la rivière des Mille-Îles	100
Figure 23 : Carte de la qualité de l'eau des rivières de la région de Laval	102
Figure 24 : Carte de la qualité des eaux du bassin versant de la rivière L'Assomption.	103

Liste des abréviations

- ADN : acide désoxyribonucléique
- ARCC : taux moyen de classification correcte
- ARN : acide ribonucléique
- ARNr : acide ribonucléique ribosomal
- BAN : sonde spécifique aux *Bifidobacterium* animaux
- BDE : sonde spécifique à *Bifidobacterium dentium*
- BOX-PCR : réaction en chaîne de la polymérase ciblant des éléments répétés extragéniques
- BSA : albumine de sérum de boeuf
- cfu : unité formatrice de colonie
- CWA : loi américaine sur la qualité de l'eau
- DBO : demande biologique en oxygène
- DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane
- dNTP : désoxynucléosidetriphosphates
- dUTP : désoxyuridinetriphosphate
- EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique
- ELISA : méthode de dosage immuno-enzymatique
- EPA : agence de protection environnementale américaine
- ERIC-PCR : réaction en chaîne de la polymérase ciblant des séquences consensus intergéniques répétées d'entérobactéries
- HPLC : chromatographie liquide haute performance
- LH-PCR : réaction en chaîne de la polymérase ciblant des séquences hétérogènes en longueur
- MUG : 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucuronide
- ONPG : o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside
- PBS : tampon phosphate salin
- PCR : réaction en chaîne de la polymérase
- pH : potentiel hydrogène
- PVPP : polyvinylpolypirrolidone

RAPD : ADN polymorphe amplifié de façon aléatoire

REP-PCR : réaction en chaîne de la polymérase ciblant des séquences extragéniques
palindromiques répétées

RT-PCR : transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne de la polymérase

SDWA : loi américaine sur la salubrité de l'eau potable

TBE : tampon Tris-Borate-EDTA

T-RFLP : polymorphismes de longueur des fragments de restriction terminaux

Introduction

L'eau étant essentielle à la survie de tous les êtres vivants, préserver sa qualité devrait constituer une priorité. La qualité microbiologique de l'eau est affectée entre autres par l'introduction de microorganismes via les fèces. Même si l'eau est traitée, il est possible que certains microorganismes pathogènes survivent pour une raison ou une autre. Ce faisant, ils peuvent être à l'origine de graves problèmes environnementaux, médicaux et économiques. Afin de minimiser les risques, il faut donc procéder à la détection de ces microorganismes pathogènes et, si possible, déterminer leurs sources. Pour déterminer le degré de contamination fécale dans l'eau, on se fie à la détection de microorganismes indicateurs tels que les coliformes fécaux. Malheureusement, la plupart des méthodes utilisées ne permettent pas de distinguer la source de la contamination, c'est-à-dire une origine humaine (pollution urbaine) ou animale (pollution agricole). D'autres méthodes ont donc été élaborées afin d'y arriver.

Puisqu'aucune de ces méthodes n'est ressortie comme étant la meilleure, la méthode idéale est toujours recherchée. C'est ce qui a motivé ce projet de recherche. Il fallait donc mettre au point une nouvelle approche moléculaire capable de distinguer l'origine de la contamination fécale dans l'eau qui pourrait surpasser les autres. En clair, cela signifie qu'il fallait élaborer de nouveaux marqueurs de contamination fécale dans l'eau. Plus spécifiquement, les objectifs étaient de concevoir des amorces spécifiques d'espèces pour le PCR, de déterminer leur spécificité, de développer des méthodes d'extraction d'ADN pour divers échantillons, d'évaluer la sensibilité des PCR et de détecter les marqueurs dans des échantillons d'eau.

Pour atteindre ces objectifs, de nombreuses expériences ont dû être réalisées. Il a d'abord fallu aligner des séquences nucléotidiques et sélectionner les amorces les plus spécifiques à chaque espèce avant de les tester avec des ADN extraits de tissus animaux. Puis, il a fallu adapter une méthode d'extraction aux divers échantillons et déterminer un moyen d'éliminer les inhibiteurs extraits avec l'ADN. Le protocole de chaque type de PCR a dû

être optimisé et les limites de sensibilité évaluées. Une fois que ces tests ont été effectués, des essais avec des fèces ont dû être exécutés question de savoir si les marqueurs y sont détectables et si la viande ingérée influe sur les résultats. Quatre tests ont ensuite été faits avec de l'eau usée provenant de la station d'épuration de Fabreville : la détection des marqueurs, la détermination de la sensibilité de détection de la méthode, l'évaluation de la durée de vie des marqueurs dans l'eau et l'évaluation de la résistance des marqueurs aux traitements infligés par la station d'épuration. Finalement, la méthode a servi à détecter les sources de contamination fécale dans le lisier de porc (brut et traité), dans l'eau recueillie sur deux fermes québécoises ainsi que dans l'eau de la rivière l'Assomption et de la rivière des Mille-Îles.

Ce mémoire de maîtrise a été construit de la manière suivante : le premier chapitre renferme tout ce qui concerne ce projet de recherche et qui est disponible dans la littérature, le deuxième chapitre explique en détails tout ce qui a été fait pour atteindre les objectifs, le troisième chapitre présente les résultats obtenus et le quatrième chapitre contient tous les éléments de discussion.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

1.1) Situation de l'eau dans le monde

Du plus petit des insectes jusqu'au plus grand des animaux en passant par les plantes, tous ont un besoin vital d'eau. Cette ressource naturelle si importante recouvre les trois quarts de la planète (Campbell, 1995), mais 97,5% de toute cette eau est imbuvable puisque, provenant des océans et des mers, elle est salée (Environnement Canada, 2004b). Le 2,5% restant est qualifié d'eau douce c'est-à-dire d'eau ayant naturellement une faible concentration en ions de calcium, de magnésium et de fer (Association Française de Normalisation, 1994). Comme plus des deux tiers de l'eau douce de la Terre se retrouvent dans les glaciers ou les calottes glaciaires et qu'à peu près un tiers est situé sous terre (Environnement Canada, 2004b), la proportion d'eau douce contenue dans les étangs, les lacs, les ruisseaux, les rivières et les fleuves est extrêmement faible (Statistique Canada, 2003). Le Canada est l'un des pays les mieux pourvus en eau douce. En effet, il détient 20% de toute l'eau douce du monde (Environnement Canada, 2004b). Environ 891 163 km² de la superficie du Canada en sont recouverts (Environnement Canada, 2004b). De plus, les Grands Lacs situés en partie sur son territoire renferment 25% de toute l'eau douce des lacs du monde (Environnement Canada, 2004b). Le Canada est également riche en terres humides : 14% de son territoire en est composé ce qui représente le quart des terres humides du monde (Environnement Canada, 2004b). Malheureusement, même si les Canadiens disposent de beaucoup d'eau douce, ils ne peuvent se permettre d'en gaspiller trop vu que seulement 7% de cette eau est renouvelable (Environnement Canada, 2004b).

1.2) Contamination de l'eau

Plusieurs pays dont le Canada font face à un problème de taille : la contamination de plus en plus élevée de leur eau. La contamination de l'eau est définie comme toute

modification chimique, physique ou biologique de la qualité de l'eau qui a un effet nocif sur les êtres vivants la consommant (Lenntech, 2004b).

1.3) Les contaminants possibles

Tout agent provoquant ces modifications est donc considéré comme étant un contaminant. Il existe tant de contaminants que pour s'y retrouver, ils ont été regroupés selon leurs caractéristiques. Huit classes ont ainsi été formées.

Il y a, entre autres, la température qui est responsable de la pollution thermique. Lorsque l'eau devient plus chaude suite au rejet d'eaux utilisées pour refroidir des systèmes industriels et des centrales électriques (Simpson, Santo Domingo et Reasoner, 2002), la solubilité de l'oxygène est diminuée ce qui pousse les organismes aquatiques à respirer plus rapidement pour obtenir la quantité d'oxygène qui leur est nécessaire. Ce phénomène peut également rendre ces organismes plus sensibles aux maladies et dans des cas extrêmes, la mort d'organismes par asphyxie peut survenir (LeBlanc, 1990).

Les sédiments en suspension sont une autre classe de contaminants (Statistique Canada, 2003). Ce sont des particules visibles comme du plancton, des débris végétaux fins et des minéraux (Groupe Total) qui contribuent à la turbidité de l'eau. Elles sont maintenues en suspension par l'action de la turbulence et une fraction seulement est décantable (Bersani, 1989).

La troisième classe regroupe tous les déchets qui peuvent être décomposés par des bactéries ayant besoin d'oxygène. Ils sont la cause, quoique indirectement, de la diminution du niveau d'oxygène de l'eau et de ce fait même, de la mort des poissons. En effet, ce ne sont pas eux, mais plutôt les bactéries qui les décomposent qui en sont responsables lorsqu'agissant en trop grand nombre (Encyclopaedia UNIVERSALIS, 1999).

Les matières fertilisantes peuvent également contribuer à la contamination de l'eau. Ce sont des nutriments contenus dans les produits azotés et les produits phosphorés

(Statistique Canada, 2003). Les produits azotés peuvent être sous forme organique comme dans l'urée, les protéines et les acides aminés ou sous forme minérale comme dans l'azote ammoniacal, l'azote nitreux ou l'azote nitrique.

Des composés organiques (atomes de carbone associés à d'autres éléments) contaminent aussi nos cours d'eau, pouvant entraîner la mort des poissons. Ils peuvent être naturels ou synthétiques et peuvent être responsables d'odeurs, de couleurs et de saveurs en plus de présenter une certaine toxicité quand dégradés en composés intermédiaires. Des exemples de composés organiques sont le pétrole, les plastiques, les alcanes, les alcènes, les alkyles, les hydrocarbures aromatiques, les détergents, les insecticides comme le DDT et les pesticides (Statistique Canada, 2003) qui peuvent s'accumuler et se concentrer tout au long de la chaîne alimentaire (Encyclopaedia UNIVERSALIS, 1999).

La contamination peut provenir des polluants inorganiques hydrosolubles. Ils comprennent les acides, les sels minéraux (chlorure ou sulfate de calcium, de magnésium, de sodium ou de potassium) et les métaux. Ces derniers incluent des métaux essentiels à la vie qui, en quantité excessive, peuvent constituer un danger tels le manganèse, le calcium et le potassium (Lenntech, 2004b) et les métaux lourds, c'est-à-dire ceux dont le numéro atomique est élevé comme le cadmium, le chrome, le mercure, le cuivre, le plomb et le zinc (Statistique Canada, 2003). Les métaux lourds s'accumulent dans les tissus des organismes vivants ainsi que dans la chaîne alimentaire devenant encore plus dangereux pour l'être humain qui se trouve à son extrémité. De plus, le mercure peut se déposer dans les sédiments où des bactéries anaérobies le transforment en méthyl-mercure très toxique pour le cerveau et les reins des personnes exposées (Statistique Canada, 2003) et certaines formes de plomb sont reconnues pour être toxiques pour la plupart des vertébrés (LeBlanc, 1990).

L'avant dernière classe contient tous les composés radioactifs hydrosolubles (LeBlanc, 1990). Ce sont en grande partie les installations nucléaires qui sont à l'origine des radio-isotopes présents dans l'eau des fleuves d'Europe.

La dernière classe, mais non la moindre, comprend les agents provoquant des maladies. Ceux-ci peuvent être soit des bactéries (*Aeromonas*, *Cyanobacteria*, *Helicobacter*, *Mycobacterium avium*, etc.), des virus (Adénovirus, Calicivirus, virus Coxsackie, Echovirus, etc.), des protozoaires (*Ancanthamoeba*, *Microsporidia*, etc.) ou encore des vers parasites (Rose et Grimes, 2001).

Ces contaminants peuvent avoir divers effets sur les organismes vivants : ils peuvent entraîner une toxicité plus ou moins forte comme plusieurs métaux et les produits de l'aflatoxine, une carcinogénicité, une neurotoxicité (insecticides), un dérangement du transfert d'énergie, une perte des fonctions reproductives et des effets sur le comportement (Lenntech, 2004a).

1.4) Causes de la contamination

L'eau de surface, l'eau souterraine, les sédiments et l'eau potable peuvent être contaminés à partir de deux types de sources. La première est dite localisée, ce qui signifie que les contaminants proviennent d'un lieu précis, par exemple d'effluents industriels (usines de pâtes et papiers, aciéries ou usines de transformation des aliments), de l'eau usée sortant des stations d'épuration, des débordements d'égouts lors d'orages, de l'exploitation des mines souterraines, des sites d'enfouissement des déchets (Ritter et al., 2002), des puits de pétrole, des pétroliers, des résidus d'abattoirs et des déchets d'établissements de recherche ou de fabrication utilisant des produits biologiques (Edge et al., 2001).

La deuxième, quant à elle, englobe tout ce qui est non-localisé, donc tout ce dont l'origine est impossible à définir. Les infiltrations de surface causées par l'épandage de fumier ou de boues d'épuration dans les champs et par le pâturage des animaux de la ferme, le ruissellement des pesticides, des herbicides, des insecticides et des engrais commerciaux utilisés dans les pratiques agricoles, les systèmes septiques inadéquats ou défectueux, les bris dans les canalisations des égouts, les déjections des animaux sauvages, l'érosion des formations géologiques, les rejets illégaux de produits chimiques (Simpson, Santo Domingo et Reasoner, 2002), les pluies acides, le trafic urbain (LeBlanc, 1990) ainsi que

les resuspensions de pathogènes et de kystes de parasites accumulés dans les sédiments (Bitton, 1999) en font entre autres partie.

1.5) Les problèmes reliés à la contamination fécale

La contamination fécale est engendrée par la présence, dans l'eau, de fèces, qu'elles soient d'origine humaine ou animale. Comme mentionné ci-haut, ce type de contamination peut provenir de sources tant localisées que non-localisées. Comme, aux Etats-Unis, 1.4 milliards de tonnes de fèces sont produites annuellement par les animaux et qu'une seule goutte de matière fécale contient des millions de microorganismes (American Society for Microbiology, 2002), il est normal que de nombreux problèmes en découlent.

1.5.1) Effets de la contamination fécale sur l'environnement

Certains composants des fèces peuvent s'associer aux matières en suspension et contribuer à la turbidité de l'eau. Ce faisant, ils sont responsables de la diminution de la pénétration de la lumière, ce qui interfère automatiquement avec le processus de photosynthèse de la flore aquatique : privées de leur source d'énergie, les algues dépérissent. Lors de leur dépôt, ces particules peuvent créer une couche suffocante autour des racines des plantes aquatiques, permettre l'attachement d'organismes vivants à la surface des roches (Simpson, Santo Domingo et Reasoner, 2002) et provoquer le colmatage des lits de rivières tout en contribuant à l'envasement de la flore et de la microfaune. Une sédimentation excessive peut aussi avoir pour effet d'épuiser les aires d'alimentation et de frayères des poissons (Statistique Canada, 2003).

Les matières fécales contiennent aussi de l'azote et du phosphore. Le phosphore peut s'accumuler dans les sédiments et être remobilisé, augmentant brutalement sa concentration dans l'eau. Quand sa concentration et celle de l'azote sont trop élevées dans l'eau, ils sont la cause de l'eutrophisation des lacs. L'eutrophisation est un phénomène entraînant une croissance excessive des algues, des plantes aquatiques (Statistique Canada, 2003) et des cyanobactéries telles *Anacystis* et *Anabaena* qui forment des fleurs d'eau (Prescott, Harley et Klein, 1995). La décomposition de ces organismes

photosynthétiques produit une grande quantité de matières organiques biodégradables qui vont être utilisées par les bactéries aérobies (Bitton, 1999). Ces dernières vont donc proliférer et consommer de plus en plus d'oxygène dissout dans l'eau jusqu'à ce qu'elles l'épuisent totalement, ce qui va résulter en l'accumulation de la matière organique au fond du lac (Campbell, 1995). Évidemment, rendu à ce stade, aucun poisson n'est en mesure de survivre, n'ayant plus d'oxygène à sa disposition. La preuve, en 1960, l'eutrophisation du Lac Érié avait causé la perte d'espèces de poissons à valeur commerciale tels le Doré bleu, le Grand Corégone et le Touladi (Campbell, 1995).

Des microorganismes pathogènes peuvent également être libérés dans les fèces et se retrouver dans l'eau. Très peu d'informations sur les pathogènes hydriques non-humains et sur les menaces qu'ils pourraient présenter pour les écosystèmes et la biodiversité sont disponibles au Canada (Edge et al., 2001). Un des effets connus est la possibilité pour les microorganismes pathogènes d'être amplifiés durant l'eutrophisation. En effet, *Vibrio cholerae* et des pseudomonades peuvent parfois s'attacher aux gaines de *Anabaena variabilis*, aux lenticules, aux nénuphars et au plancton. Puisque le phytoplancton est ingéré par le zooplancton, celui-ci amplifie *Vibrio* et peut ensuite le transmettre (Ford et Colwell, 1995). D'autres exemples de menaces, engendrées par des pathogènes, ont été décrits par Edge et al. en 2001 : *Clostridium botulinum* a été relié au décès de nombreuses sauvagines (oiseaux) suite à plusieurs éclosions de botulisme et des pathogènes fongiques et viraux ont été tenus pour responsables de la réduction massive des populations d'amphibiens tels les salamandres tigrées en Saskatchewan. Il a également été démontré que *Pfiesteria* est l'agent causal d'ulcères chez les poissons (American Society for Microbiology, 2002).

1.5.2) Problèmes médicaux reliés à la contamination fécale

Chaque année, les maladies causées par l'eau non potable, le manque d'installations sanitaires et la mauvaise hygiène due à la pénurie d'eau tuent plus de cinq millions de personnes dans le monde. Dans les pays en développement, 80% des maladies sont d'origine hydrique (Environnement Canada, 2004b). À elles seules, les maladies entériques d'origine hydrique sont responsables de la mort d'au moins deux millions

d'enfants (Rose et Grimes, 2001) et affectent neuf cent millions de personnes chaque année à travers le monde (Ford et Colwell, 1995). Au Canada, quatre-vingt-dix décès et quatre-vingt-dix mille cas d'infections aiguës d'origine hydrique seraient enregistrés annuellement (Edge et al., 2001).

La plupart des microorganismes pathogènes humains qui se retrouvent dans l'eau (voir Tableau 1) proviennent principalement des fèces humaines et animales (American Society for Microbiology, 2002). En effet, les fèces constituent une riche source de bactéries : un gramme en contenant jusqu'à 10^{12} , ce qui représente approximativement 9% du poids (Bitton, 1999). D'autres pathogènes peuvent être excrétés avec les fèces comme des virus et des protozoaires (Leclerc, Schwartzbrod et Dei-Cas, 2002).

Tableau 1 : Principaux microorganismes et maladies hydriques correspondantes.

Classe de microorganismes	Espèces	Maladies
Bactéries	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Diarrhée ²
	<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra ¹
	<i>Escherichia coli</i>	Gastro-entérite ¹
	<i>Shigella</i>	Dysenterie ¹
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Dermatoses/otites ²
	<i>Helicobacter pylori</i>	Cancer de l'estomac ¹
	<i>Legionella pneumophila</i>	Légionellose ¹
	<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastro-entérite ¹
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastro-entérite ¹
	<i>Salmonella typhi</i>	Fièvre typhoïde ¹
	<i>Salmonella paratyphi</i>	Fièvre paratyphoïde ¹
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose ¹
	<i>Leptospira</i>	Leptospirose ¹
<i>Bacteroides fragilis</i>	Diarrhée ¹	
<i>Chlamydia</i>	Inflammation des yeux ²	

Virus	<p>Poliovirus</p> <p>Coxsackievirus</p> <p>Échovirus</p> <p>Entérovirus</p> <p>Virus de l'hépatite A, E</p> <p>Réovirus</p> <p>Rotavirus, Astrovirus, virus de Norwalk, Calicivirus</p> <p>Adénovirus</p>	<p>Paralysie, méningite¹</p> <p>Méningite, Herpangie, Pleurodynie¹</p> <p>Péricardite, myocardite, méningite¹</p> <p>Méningite¹</p> <p>Hépatite A, E¹</p> <p>Maladie respiratoire¹</p> <p>Gastro-entérite¹</p> <p>Conjonctivite¹</p>
Protozoaires	<p><i>Giardia lamblia</i></p> <p><i>Giardia intestinalis</i></p> <p><i>Entamoeba histolytica</i></p> <p><i>Balantidium coli</i></p> <p><i>Cryptosporidium parvum</i></p> <p><i>Acanthamoeba castellanii</i>,</p> <p><i>Naegleria gruberi</i> et <i>fowleri</i></p> <p><i>Pfiesteria</i></p> <p><i>Microsporidia</i></p>	<p>Giardiose¹</p> <p>Diarrhée</p> <p>Dysenterie¹</p> <p>Dysenterie/ulcères intestinaux¹</p> <p>Cryptosporidiose¹</p> <p>Méningo-encéphalite amibienne¹</p> <p>Effet neurologique³</p> <p>Diarrhée¹</p>
Parasites	<p><i>Taenia spp.</i></p> <p><i>Ascaris lumbricoides</i></p> <p><i>Toxocara canis</i></p> <p><i>Trichuris trichiura</i></p> <p><i>Schistosoma mansoni</i></p>	<p>Problème entérique¹</p> <p>Ascariose¹</p> <p>Dommage oculaire¹</p> <p>Trichuriase¹</p> <p>Schistosomiase¹</p>

¹ Tirés de Bitton, 1999

² Tirés de Köster, Egli et Rust, 2002

³ Tiré de American Society for Microbiology, 2002

Il est possible d'entrer en contact avec un de ces agents infectieux de différentes manières. Ce peut être simplement en buvant de l'eau impropre à la consommation ou encore en mangeant du poisson, des crustacés ou des mollusques ayant été élevés en eau contaminée. Ce peut être aussi lors de l'ingestion de légumes ou de fruits crus qui ont préalablement été irrigués ou lavés avec de l'eau contaminée (Ford et Colwell, 1995). Les aérosols produits durant les douches ainsi que l'eau utilisée pour les bains peuvent également constituer une façon pour ces pathogènes d'atteindre un hôte (Köster, Egli et Rust, 2002). De plus, le contact microorganisme-humain peut avoir lieu lors d'activités récréatives pratiquées dans ou sur l'eau telles que la natation, la voile, le ski nautique et le canotage (Ford et Colwell, 1995).

Au 19^e siècle, les épidémies de choléra, de typhus et de dysenterie dues à des contaminations de l'eau potable étaient monnaie courante en Europe. La grave épidémie de choléra de 1849 à Londres et celle de 1892 qui fit 10 000 victimes à Hambourg, en Allemagne, n'en sont que quelques exemples (Prescott, Harley et Klein, 1995). Avec l'instauration d'installations de traitement des eaux au début du 20^e siècle (Bitton, 1999), une réduction importante du nombre d'épidémies reliées à l'eau a été observée dans les pays industrialisés. Cependant, au fur et à mesure que les infrastructures municipales prennent de l'âge et se détériorent, une recrudescence marquée d'éclosions de maladies hydriques a été observée. C'est ce qui a été remarqué, entre autres, en Union Soviétique où le choléra a fait sa réapparition (Ford et Colwell, 1995).

Entre 1974 et 1996, environ 200 éclosions de maladies infectieuses associées à l'eau potable ont été répertoriées au Canada. Les 8000 cas ayant été reliés à ces éclosions ne constituent probablement que la pointe de l'iceberg, le nombre de cas réels étant sans doute 10 à 1000 fois plus élevé. Cette estimation tient compte du fait que ce ne sont pas tous les cas qui sont rapportés et que des erreurs de diagnostic ont pu survenir. Des 203 éclosions, 78 ont été causées par *Salmonella*, *Shigella* et *Campylobacter*, 59 ont été provoquées par des protozoaires comme *Giardia* et *Cryptosporidium*, 43 n'ont pas été reliées à un pathogène en particulier et 23 ont été engendrées par le virus de Norwalk ou le virus de l'hépatite A (Edge et al., 2001). En 1980, la consommation d'eau contaminée

était responsable de la mort de 25 000 personnes par jour à travers le monde. Aux États-Unis, 34 épidémies associées à l'eau potable ont été dénombrées en 1991 et 1992 (Bitton, 1999). En 1995-1996, 31,8% des épidémies étaient reliées à l'eau potable prise en surface et 59,1% étaient reliées à l'eau potable prise sous terre. Cela s'explique par l'absence de traitement de l'eau souterraine due à la croyance que les couches naturelles du sol suffisent à la tâche ou par l'emploi de traitements inadéquats. En 1997-1998, l'eau potable contaminée a été responsable de 17 épidémies rendant 2038 Américains malades. De ces 17 épidémies, 15 étaient dues à l'eau souterraine et seulement 2 à l'eau de surface. La proportion d'épidémies reliées à l'eau souterraine a donc augmenté de 29,1% et celle d'épidémies reliées à l'eau de surface a diminué de 20% (Barwick et al., 2000). En 1999-2000, le nombre d'épidémies des deux genres a augmenté de 87% pour le premier et de 6,1% pour le deuxième (Lee et al., 2002). Voici quelques exemples d'épidémies reliées à la consommation d'eau potable qui sont survenues ces 25 dernières années :

- En 1979-1980 à Ismaning (Danemark), 2450 personnes ont souffert de dysenterie bactérienne suite à la contamination d'un captage d'eau potable due à l'introduction de *Shigella* provenant des conduits d'évacuation des eaux usées défectueux (Köster, Egli et Rust, 2002).
- L'une des épidémies récentes les plus mortelles est sans contredit celle qui a débutée en 1991 en Amérique du Sud et s'est terminée quatre ans plus tard après que le choléra ait rendu plus d'un million de personnes malades et fait au moins 10 000 victimes (Atlas et Bartha, 1998).
- En 1993 à Milwaukee au Wisconsin, 54 personnes sont mortes et plus de 403 000 autres ont été affectées par *Cryptosporidium parvum*. Les oocystes de ce protozoaire se sont retrouvés dans l'eau potable à cause de filtres défectueux dans le système de traitement (Edge et al., 2001; Köster, Egli et Rust, 2002).
- Deux ans plus tard, la ville de Victoria en Colombie-Britannique était aux prises avec une épidémie de toxoplasmose associée à l'approvisionnement municipal en eau potable. La même année, des cas d'hépatites A ont été rapportés à l'Île d'Orléans, au Québec (Edge et al., 2001).

- La Suisse recense en moyenne 40 à 80 cas de maladies du légionnaire par an. Habituellement, dix pour cent des patients n'y survivent pas. En 1998, il y a eu 78 légionelloses dont 8 qui furent mortelles (Köster, Egli et Rust, 2002).
- Il y a quatre ans, la ville de Walkerton en Ontario a été en proie à une épidémie sévère : 7 personnes sont décédées et 2300 ont été gravement malades (Hrudey et al., 2003). Des pluies torrentielles avaient lessivé du purin de bovins à un moment où le système de chloration de l'usine de filtration était défectueux, entraînant la contamination de l'eau potable des puits par des *E. coli* entérohémorragiques de souche O₁₅₇ : H₇ (Rose et Grimes, 2001).

Les aliments contaminés par l'eau peuvent aussi être responsables d'épidémies. Des huitres contaminées par le virus de Norwalk ont été identifiées comme la source d'épidémies en Floride, en Louisiane, au Maryland, au Mississippi et à New York. En 1997, des fraises importées, contaminées avec le virus de l'hépatite A, ont rendu malades 150 étudiants et professeurs du Michigan. D'autres éclosions d'hépatite A ont eu pour origine de la laitue. Il y a aussi eu des épidémies de diarrhée causées par la consommation de framboises contaminées avec *Cyclospora* (American Society for Microbiology, 2002).

L'eau à laquelle nous sommes exposés lors d'activités récréatives peut également être à l'origine de maladies. En 1997-1998, 32 épidémies lui ont été attribuées aux États-Unis, affectant 2128 personnes de différents maux : des gastroentérites, des méningo-encéphalites amibiennes primaires, des maladies du hamburger et des dermatites (Barwick et al., 2000). En 1998, des enfants jouant dans un parc aquatique près d'Atlanta ont été en contact avec une souche d'*E. coli* mortelle provenant de fèces. La quantité de chlore étant insuffisante, vingt-quatre d'entre eux sont tombés malades et 2 sont morts de dommages aux reins et d'autres complications (Rose et Grimes, 2001). En 1999-2000, 59 épidémies ont eu lieu. Au total, 2093 personnes ont été affectées dont 4 qui sont mortes (Lee et al., 2002). Un autre exemple est survenu il y a 3 ans. Soixante-neuf résidents d'Atlanta se sont retrouvés malades après avoir contracté *Shigella* dans une piscine mal désinfectée (American Society for Microbiology, 2002).

Les pathogènes ne sont pas l'unique cause de maladies attribuées à la contamination fécale de l'eau potable. En effet, l'azote provenant des fèces peut présenter un certain risque. Lorsqu'un nouveau-né en ingère sous forme d'ion nitrate, il peut développer le syndrome du bébé bleu. Cette maladie aussi appelée méthémoglobinémie résulte de la transformation du nitrate en nitrite qui modifie l'hémoglobine de sorte à la rendre incapable de transporter l'oxygène (Statistique Canada, 2003).

1.5.3) Répercussions économiques de la contamination fécale

Le traitement des maladies d'origine hydrique engendre des coûts élevés en soins médicaux de toutes sortes. En effet, en 1980, le pourcentage des lits d'hôpitaux occupés par des personnes devenues malades après avoir consommé de l'eau contaminée était de 25, ce qui est énorme (Bitton, 1999) considérant que toutes les autres causes possibles d'hospitalisation doivent se contenter de 75% des places disponibles.

L'industrie touristique subit de lourdes pertes quand l'eau de baignade présente une forte contamination fécale. Entre 1992 et 1995, 169 plages publiques situées au bord des lacs Ontario, Érié, Huron et Supérieur ont rapporté 2839 fermetures. Durant l'été 1998, pas moins de 729 plages américaines ont dû fermer pendant au moins une journée (American Society for Microbiology, 2002) ce qui représente au total 7000 jours de plage perdus principalement au New Jersey, en Californie et en Floride (Rose et Grimes, 2001). L'été suivant, la plage d'Huntington en Californie a été obligée de fermer à cause de la présence d'entérocoques et de coliformes en quantité élevée. Non seulement les commerçants locaux ont perdu des millions de dollars découlant de l'absence de vacanciers, mais l'enquête pour identifier la source, qui a coûté 2 millions de dollars, a échoué.

L'aquiculture est un autre domaine qui peut pâtir de la contamination de l'eau. En effet, la présence de pathogènes animaux dans les eaux d'approvisionnement risque d'influencer de façon importante la production d'espèces de poissons comestibles destinés à la consommation intérieure ou à l'exportation (Edge et al., 2001). Une fois que

la contamination est détectée, des mesures sont prises afin de l'enrayer. Des milliers de poissons peuvent être tués, comme en 1997, lorsqu'une épidémie sévissait dans la région de Chesapeake Bay. À cause de cette situation, une compagnie a essuyé des pertes de quarante-trois millions de dollars (American Society for Microbiology, 2002). Une alternative est de fermer l'aquiculture jusqu'à ce que la situation soit rétablie comme avait décidé de faire l'élevage d'huîtres de Galveston Bay au Texas en 1998. Cela a évidemment entraîné de grosses pertes financières, mais en fermant 4 mois, ils ont réussi à limiter le nombre de malades à 367 (Rose et Grimes, 2001).

Les municipalités peuvent, elles aussi, écopier financièrement de la contamination fécale de l'eau. D'un côté, lorsque la présence de pathogènes dans l'eau potable est confirmée, elles doivent s'assurer d'empêcher toute récurrence en apportant les correctifs qui s'imposent tels que de réparer les composantes des étapes cruciales de l'usine de filtration ou d'effectuer des réparations dans les égouts par exemple. De plus, avant toute chose, elles doivent engager des experts pour localiser le problème, ce qui peut s'avérer long et coûteux. D'un autre côté, quand les particules de fèces en suspension forment des dépôts dans les canalisations de leur réseau, elles doivent remédier à cette situation en les nettoyant ou en les changeant, ce qui entraîne encore des dépenses.

1.6) Réglementations sur la qualité des eaux

Aux États-Unis, il y a 2 lois fédérales sur la sécurité de l'eau qui sont administrées par l'agence de protection environnementale, l'EPA. La première s'appelle la loi sur l'eau potable sécuritaire (SDWA). Elle a pour objectif de protéger l'eau destinée à la consommation en établissant des critères et des règles pour les niveaux de divers polluants. La deuxième, la loi de l'eau propre (CWA) sert à protéger les lacs et rivières du pays. Elle régule le rejet de polluants dans les eaux grâce, entre autres, à des critères sur le traitement des eaux usées (American Society for Microbiology, 2002).

Au Canada, il n'existe pas de lois pour la qualité de l'eau. Les gouvernements fédéral, provinciaux et territoriaux ont plutôt décidé d'élaborer des recommandations dont l'application se fait de façon volontaire ou obligatoire selon l'endroit (Le Conseil

Canadien des Ministres de l'Environnement, 2002). Les recommandations canadiennes pour la qualité des eaux sont subdivisées en six :

- Les recommandations pour la qualité des eaux : protection de la vie aquatique dont le but est de protéger la flore et la faune aquatique en établissant des limites pour 85 paramètres microbiologiques, physiques, chimiques et radiologiques pouvant affecter la qualité de l'eau selon les données toxicologiques disponibles pour les espèces sensibles.
- Les recommandations pour la qualité des eaux : protection des utilisations de l'eau à des fins agricoles qui aident à protéger les cultures sensibles et l'eau d'abreuvement du bétail. Par exemple, les recommandations pour les coliformes fécaux et pour les coliformes totaux dans l'eau d'irrigation sont de 100 par 100 ml et de 1000 par 100 ml respectivement.
- Les recommandations pour la qualité des sédiments : protection de la vie aquatique. Comme l'implique leur nom, elles visent à protéger les organismes aquatiques vivant sur ou dans les sédiments se trouvant au fond des lacs et des rivières.
- Les recommandations pour les résidus dans les tissus : protection des espèces fauniques consommant le biote aquatique ciblent les mammifères et les oiseaux se nourrissant de poissons, de mollusques, de crustacés et d'algues.
- Les recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada ont, quant à elles, le mandat de protéger la santé des Canadiens en définissant des concentrations maximales acceptables pour les substances présentes dans l'eau potable.
- Les recommandations au sujet de la qualité des eaux utilisées à des fins récréatives au Canada. Elles aident à protéger la santé des Canadiens pratiquant la natation, la plongée, les sports en eau vive, la voile, le canotage et la pêche (Environnement Canada, 2003).

1.7) Traitement de l'eau

Grâce aux mesures contemporaines de traitement de l'eau, la contamination microbienne se fait beaucoup plus rare. La fièvre typhoïde, le choléra et la dysenterie appartiennent maintenant au passé, mais de nouvelles menaces ont pris leur relève (American Society for Microbiology, 2002). Au Canada et aux États-Unis, des problèmes relatifs à la qualité de l'eau sont encore couramment éprouvés bien que les pathogènes d'origine hydriques soient mieux contrôlés que dans les pays en développement. Cette situation est due aux modifications des habitudes d'utilisation de l'eau, à la pollution croissante de l'eau, au vieillissement des stations d'épuration, à la désuétude des protocoles d'évaluation des risques et au peu de connaissances disponibles sur les microorganismes dans l'environnement (Edge et al., 2001).

Il existe deux sortes d'installations de traitement de l'eau : les stations d'épuration qui servent à traiter l'eau usée provenant des égouts et les usines de filtration qui se chargent de produire l'eau potable à partir de l'eau de rivières.

1.7.1) Les stations d'épuration

L'épuration est essentielle pour empêcher les effluents pollués de provoquer la destruction totale des écosystèmes aquatiques. Les premières stations d'épuration ont vu le jour au début du 20 siècle. En 1999, environ 15 000 d'entre elles traitaient approximativement 37 milliards d'eaux usées par jour aux États-Unis (Bitton, 1999). Au Canada, seulement 6% de la population urbaine vit dans des municipalités sans usine d'épuration, c'est dire à quel point elles sont devenues importantes en peu de temps (Environnement Canada, 2004b).

Les stations d'épuration doivent atteindre plusieurs objectifs à la fois. Les différentes étapes par lesquelles passe l'eau usée, doivent réussir à réduire la quantité de matières organiques, à éliminer ou du moins à diminuer les métaux toxiques, les nutriments et les éléments traces organiques non biodégradables, toxiques ou carcinogènes, en plus d'éliminer ou d'inactiver les pathogènes (Bitton, 1999).

Idéalement, l'épuration de l'eau usée devrait se faire en 5 phases : le pré-traitement, le traitement primaire, le traitement secondaire, le traitement tertiaire et le traitement des boues.

Le pré-traitement sert à retirer les solides qu'ils soient en suspension ou qu'ils flottent. Il débute par une étape de dégrillage qui consiste à faire passer l'eau à travers des grilles à barreaux verticaux pour retenir les gros déchets comme les branches d'arbres, des morceaux de plastique, des papiers, des bouteilles et des feuilles. Ensuite, l'eau est soumise à une étape de dessablage et de déshuilage. Le sable est raclé dans le fond tandis que les huiles et les graisses sont récupérées à la surface après une aération (LeBlanc, 1990).

Le traitement primaire enlève seulement les matières en suspension (Statistique Canada, 2003). En eaux calmes, la matière se dépose au fond par gravité (décantation). Des produits agglomérants qui ont la particularité de diminuer les forces de répulsion électrostatiques peuvent être ajoutés pour accélérer le processus de décantation de certaines particules plus difficiles à faire sédimenter comme les colloïdes (LeBlanc, 1990). En sortant de ce bassin, 30 à 40% de la DBO (demande biologique en oxygène) est parti (Atlas et Bartha, 1998).

Le traitement secondaire est un traitement biologique qui a pour but d'éliminer la charge carbonée. Le principe est de mettre l'eau usée en contact avec une biomasse épuratrice. Plusieurs méthodes ont été mises au point pour y arriver. En conditions aérobies certaines utilisent des microorganismes associés à des surfaces alors que d'autres se basent sur la suspension homogène des microorganismes. Dans la première catégorie, on retrouve les filtres à percolation, les disques biologiques, les filtres submergés et les lits fluidisés. La deuxième catégorie inclut, quant à elle, les boues activées et les étangs aérés (Atlas et Bartha, 1998). En conditions anaérobies, 3 méthodes sont disponibles : les cuves simples, les biofiltres et les réacteurs à lits fluidisés (Bal et Daghat, 2001). Après le traitement secondaire, il ne reste plus que 10% à 20% de la DBO initiale (Atlas et Bartha, 1998).

Le traitement tertiaire est utilisé pour réduire encore plus la DBO et enlever les nutriments, les pathogènes ainsi que les substances toxiques (Bitton, 1999). Par exemple, les filtres au carbone sont employés pour ôter les polluants organiques non-biodégradables, le phosphate est précipité en phosphate de calcium ou de fer et l'azote est volatilisé sous forme de NH_3 à pH élevé (Atlas et Bartha, 1998). De plus, on procède à une désinfection pour tuer les pathogènes. Celle-ci peut s'effectuer par chloration avec du Cl_2 , du $\text{Ca}[\text{OCl}]_2$ ou du NaOCl , par chloramination, par ozonation ou par irradiation aux rayons ultraviolets (Ministère de l'Environnement, 1989; Service de la Vie Communautaire, de la Culture et des Communications, 2003).

Finalement, le traitement des boues générées par les traitements primaire et secondaire vise à réduire leur volume. Les boues sont asséchées partiellement ou digérées par des microorganismes avant d'être enfouies, épandues ou incinérées (Bersani, 1989).

1.7.2) Les usines de filtration

Dans la plupart des cas, l'eau doit d'abord être traitée dans des usines de filtration pour être qualifiée de potable c'est-à-dire pour être considérée comme exempte de microorganismes pathogènes et de substances chimiques nocives. Passer outre ce traitement risque de causer de graves conséquences au niveau de la santé des consommateurs. Environ 4000 usines de filtration sont en fonction au Canada (Statistique Canada, 2003).

Il existe 2 types d'usines de filtration : les usines de filtration conventionnelles et les usines dites adoucissantes (Bitton, 1999).

Dans les usines de filtration conventionnelles, le traitement de l'eau se fait habituellement en 3 étapes:

- La sédimentation constitue la première étape. Grâce à elle, le sable, le gravier et d'autres particules seront séparés de l'eau. La sédimentation peut être accélérée

en ajoutant un coagulant du genre sulfate d'aluminium, sulfate ferrique ou chlorure ferrique. Pour améliorer l'action des coagulants, l'eau peut aussi être additionnée de silice activée, de bentonite, de polyélectrolytes et même d'amidon. Les floes produits par la coagulation emprisonnent des microorganismes et absorbent la matière organique et les sédiments. À la sortie du clarificateur, 74% à 99.4% des coliformes ont été éliminés (Bitton, 1999).

- La deuxième étape est la filtration. L'eau doit traverser des milieux poreux afin de remédier à sa turbidité et aux particules en suspension. Trois types de filtration peuvent être utilisés : la filtration lente sur sable, la filtration rapide sur sable et la filtration sur terre diatomée (Bitton, 1999).
- Le traitement conventionnel se termine avec la désinfection de l'eau. La désinfection consiste à inactiver les pathogènes par divers moyens. Il peut s'agir de chloration, de chloramination, d'ajout de dioxyde de chlore, d'ozonation, d'exposition aux rayons ultraviolets, de l'action des radiations solaires ou encore de l'ajout de dioxyde de titane combiné avec la présence de lumière fluorescente ou de lumière du soleil (Bitton, 1999).

Les usines « adoucissantes », pour leur part, enlèvent la dureté de l'eau due à la présence de magnésium et de calcium en favorisant leur précipitation. La suite du traitement suit exactement les étapes des usines conventionnelles, l'eau est filtrée, puis désinfectée (Bitton, 1999).

1.8) Détection de la contamination fécale

Afin de s'assurer de l'efficacité des traitements en usage dans les stations d'épuration et les usines de filtration ainsi que du respect des recommandations canadiennes concernant la présence de pathogènes dans les différents types d'eau, il a fallu mettre au point des méthodes permettant de détecter la contamination fécale. Comme détecter directement les pathogènes serait trop coûteux, les chercheurs se sont tournés vers la détection d'indicateurs de contamination fécale. Il s'agit d'organismes dont la présence traduit l'état de l'eau (Prescott, Harley et Klein, 1995). L'indicateur idéal devrait posséder toutes les caractéristiques suivantes : il devrait faire partie de la microflore intestinale des

animaux; il devrait être présent en même temps que les pathogènes et être plus nombreux qu'eux; il devrait être au moins aussi résistant aux stress environnementaux et à la désinfection que les pathogènes; il ne devrait pas pouvoir se multiplier dans l'environnement; il devrait être facilement et rapidement détectable par des méthodes peu coûteuses; et il ne devrait pas présenter de risques pour la santé humaine (Bitton, 1999).

De nombreux indicateurs ont été développés au cours des années. Les coliformes totaux sont les premiers à avoir été utilisés. En effet, leur adoption par le Public Health Service aux États-Unis remonte à 1914 (Bitton, 1999). Les coliformes totaux sont des bactéries en forme de bâtonnets aérobies et anaérobies facultatives, Gram négatif, qui ne forment pas de spores et qui sont capables de fermenter le lactose tout en produisant du gaz lorsqu'incubées 48 heures à 35°C (Bitton, 1999). Il est possible de les détecter de plusieurs façons. La première teste la capacité à fermenter. Cinq tubes de bouillon lactosé ou de lauryl tryptose sont inoculés avec chacun des trois différents volumes d'eau (10 mL, 1 mL et 0.1 mL). Après 24 heures à 35°C, les tubes produisant du gaz, donc contenant des coliformes, sont soumis au test de confirmation dans du milieu lactosé bilié au vert brillant. Le nombre de tubes considérés positifs lors du test présomptif est reporté dans la table de détermination du nombre le plus probable par 100 mL (Prescott, Harley et Klein, 1995). La deuxième fait appel à la croissance sur milieux sélectifs et s'appelle la technique des membranes filtrantes. Comme l'implique son nom, il faut faire passer l'eau à travers une membrane en ester cellulosique. La membrane est ensuite placée sur le milieu solide d'Endo et les coliformes dénombrés après incubation (Prescott, Harley et Klein, 1995). La troisième est basée sur la production d'acide. Il s'agit du test de présence-absence : l'échantillon d'eau sert à inoculer un flacon de bouillon trois fois concentré contenant du milieu lactosé, du milieu au sulfate de lauryle et du violet de bromocrésol. Après incubation, si une couleur jaune est observée, donc s'il y a production d'acide, la présence de coliformes est démontrée (Prescott, Harley et Klein, 1995). La quatrième, quant à elle, consiste à mesurer l'activité enzymatique de la β -galactosidase. Des tests enzymatiques sont pratiqués et l'hydrolyse de substrats chromogéniques, de composés fluorogéniques ou de composés chémiluminescents indique la présence de coliformes totaux (Bitton, 1999).

Les coliformes fécaux ou thermotolérants peuvent également servir d'indicateurs de contamination fécale. Ce sont tous les coliformes pouvant fermenter le lactose à 44.5°C. Leur détection peut se faire par observation de production de gaz suite à leur croissance dans du bouillon EC ou par observation de colonies bleues sur gélose m-FC contenant du bleu d'aniline suite à la technique des membranes filtrantes (Bitton, 1999).

Escherichia coli peut à elle seule constituer un indicateur de pollution fécale. De nombreuses méthodes ont été développées afin d'en faire la détection. Trois d'entre elles utilisent la capacité qu'a la β -glucuronidase pour hydrolyser le 4-méthylumbelliférol glucuronide en produits fluorescents pouvant être visualisés sous une lampe à ultraviolets. Il s'agit de celle des tests enzymatiques, de celle du nombre le plus probable dans laquelle la fluorescence est observée après que l'échantillon ait été incubé 24 heures dans du bouillon lauryl-tryptose additionné de 4-méthylumbelliférol glucuronide 100 mg/l, et de celle des membranes filtrantes, puisque les colonies positives pour la β -glucuronidase sont fluorescentes ou possèdent un halo fluorescent. Une méthode immunologique parvient aussi à détecter *E. coli*. Des anticorps monoclonaux sont dirigés contre les protéines de la membrane externe comme OmpF ou contre la phosphatase alcaline qui se trouve dans l'espace périplasmique. Une méthode moléculaire est également disponible. Elle consiste à amplifier par PCR des gènes spécifiques à *E. coli* tels *lacZ* et *lamB* avant de les hybrider avec une sonde (Bitton, 1999).

Au moins deux tests commerciaux, le test Autoanalysis Colilert et le ColiPAD™, permettent de détecter à la fois les coliformes totaux et *E. coli*. Dans le test Autoanalysis Colilert, les bactéries sont cultivées sur un milieu minimal o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside et 4-méthylumbelliférol- β -D-glucuronide. Après 24 heures à 35°C, le clivage de l'ONPG par les coliformes engendrera un virage du milieu vers le jaune tandis que la modification du MUG par les *E. coli* rendent le milieu fluorescent lorsqu'examiné sous une lampe U.V. (Prescott, Harley et Klein, 1995). Dans le ColiPAD™, l'hydrolyse du chlorophénol red- β -D-galactopyranoside et du 4-méthylumbelliférol glucuronide rend les coliformes violets et les *E. coli* fluorescents (Bitton, 1999).

Un autre groupe de bactéries sert d'indicateur : les streptocoques fécaux. La totalité de ces derniers ou seulement les entérocoques peuvent être détectés en incorporant des substrats fluorogéniques ou chromogéniques dans les milieux sélectifs ou en effectuant des tests miniaturisés faisant appel à des plaques de microtitration. Deux autres méthodes peuvent être utilisées pour indiquer seulement la présence d'entérocoques : Enterolert, un test du nombre le plus probable basé sur l'hydrolyse du méthylumbelliféryl (Bitton, 1999) et la technique des membranes filtrantes sur une gélose KF avec du chlorure de triphényltétrazolium (Prescott, Harley et Klein, 1995).

D'autres bactéries peuvent remplir le rôle d'indicateur. Parmi celles-ci, on compte *Clostridium perfringens* (indique les virus, les kystes de protozoaires et les oocystes de *Cryptosporidium parvum*), les bifidobactéries (pouvant être détectées grâce à des sondes d'ARNr), les *Bacteroides spp* (pouvant être détectés par un test d'antisérum fluorescent), les mycobactéries productrices d'acide et les bactéries hétérotrophes. Cette dernière catégorie englobe les bactéries anaérobies strictes et facultatives qui tirent leur carbone et leur énergie de composés organiques. La croissance de ces bactéries a lieu à 35°C pendant 48 heures sur un « plate count agar » (Bitton, 1999).

Des virus tels les coliphages et les bactériophages des *Bacteroides spp.* peuvent aussi être utilisés afin d'indiquer s'il y a ou non présence de contamination fécale. Trois étapes sont nécessaires pour les détecter dans l'eau : la concentration des phages, la décontamination des concentrats et la numération. Deux façons de concentrer les phages existent. Il s'agit de l'absorption sur des membranes chargées positivement ou négativement suivie d'une élution et de la technique de floculation magnétite-organique. Un plus grand choix de méthodes est offert pour décontaminer les phages concentrés des autres microorganismes. En effet, cette étape peut être réalisée par extraction au chloroforme, filtration à travers des membranes, ajout d'antibiotiques, utilisation de milieux sélectifs ou traitement au peroxyde d'hydrogène suivi de culture sur un milieu supplémenté de cristal violet. Quant au dénombrement des phages, il s'effectue traditionnellement par les méthodes des simples ou des doubles couches d'agar et par

celle du nombre le plus probable. Il peut également se faire en détectant la libération de β -galactosidase causée par la lyse des hôtes bactériens, en détectant la réaction colorimétrique d'un liquide produite par un test de présence-absence ou en amplifiant l'ARN des phages par RT-PCR. À l'exception des 2 dernières méthodes, toutes ont besoin de bactéries pour mettre en évidence les phages. Selon le type de bactériophages, différentes bactéries sont requises. Par exemple, les coliphages somatiques s'attaquent aux *E. coli* C et les phages mâle-spécifiques à *Salmonella typhimurium* ou aux *E. coli* souche HS[pFamp]R (Bitton, 1999).

La dernière classe d'indicateurs ne répond pas tout à fait à la définition fournie précédemment, puisqu'elle regroupe des substances chimiques au lieu d'organismes. Les stérols fécaux i.e. le coprostanol, le coprostérol, le cholestérol et le coprostanone, les acides biliaires qui incluent les acides déoxycholiques et lithocholiques, et le chlore résiduel libre en font partie. De plus, le niveau d'endotoxines produites par les bactéries Gram négatif est mesuré par le test du « *Limulus amoebocyte lysate* » puisqu'une relation entre leur présence et celle de coliformes est suspectée (Bitton, 1999).

1.9) Détermination de la source de la contamination fécale

Si établir la présence de pollution fécale dans l'eau est important, déterminer sa source l'est tout autant. En effet, protéger les sources d'eau, les restaurer, réduire la quantité de nutriments, prévoir le type de pathogènes impliqués, réduire le danger des maladies infectieuses d'origine hydrique et désigner un pollueur coupable passent par la détermination de la source de la contamination (Nebra, Bonjoch et Blanch, 2003; Hagedorn et al., 1999; Ha et Stenstrom, 2000). Détenir des informations sur la source de la pollution permet de gérer de façon efficace les problèmes afin d'éliminer la contamination sans pertes d'argent et de temps (Simpson, Santo Domingo et Reasoner, 2002; Malakoff, 2002). Malgré leur grande utilité, les indicateurs sont incapables d'identifier l'animal responsable de la présence de matières fécales dans l'eau (Nebra, Bonjoch et Blanch, 2003). D'autres méthodes ont donc été mises au point.

1.9.1) Méthodes microbiologiques

De nombreuses méthodes sont basées sur la culture des microorganismes. C'est le cas de celles basées sur *Bacteroides distasonis* (Khatib, Tsai et Olson, 2002), *B. fragilis* (Nebra, Bonjoch et Blanch, 2003) et *Rhodococcus coprophilus* qui est indicateur de bétail (Sinton, Finlay et Hannah, 1998). Celles s'attardant aux différentes espèces de streptocoques fécaux associées à des animaux en particulier et à leurs proportions relatives dans leur fèces le sont aussi (Dombek et al., 2000; Hagedorn et al., 1999).

C'est également le cas du ratio coliformes fécaux sur streptocoques fécaux. Il permet de différencier la contamination humaine de la contamination animale vu que les fèces humaines contiennent plus de coliformes et les déjections animales plus de streptocoques. Donc, lorsque sa valeur est d'au moins 4, il indique une origine humaine tandis que lorsque sa valeur est plus petite que 0.7, il indique une origine animale (Bitton, 1999; Bahirathan, Puente et Seyfried, 1998). Le ratio coliformes fécaux sur coliformes totaux peut aussi s'avérer utile. En effet, quand il excède 0.1, il suggère la présence de contamination humaine (Ha et Stenstrom, 2000).

Selon une étude faite par Bahirathan et al. (1998), les entérocoques possédant un pigment jaune, *Enterococcus casseliflavus* et *Enterococcus mundtii*, peuvent relier la contamination à sa source. Selon cette méthode, l'eau est filtrée et les filtres sont déposés sur un milieu m-Enterococcus. Ensuite, deux options s'offrent : utiliser les colonies résultantes pour procéder à des tests de susceptibilité à la vancomycine ou soumettre leur ADN génomique à des analyses impliquant l'enzyme de restriction *SstI*. La résistance à la vancomycine est significativement plus élevée chez les bactéries ayant pour origine des animaux sauvages que chez celles ayant pour origine des animaux domestiques, des animaux de la ferme ou des humains. Quant à la méthode utilisant l'enzyme *SstI*, elle a permis d'identifier douze types d'ADN (A-L) chez *Enterococcus mundtii* : les types A, B, C et D se retrouvent chez le chien, les types E et D chez l'humain, les types F, G et H chez le cheval, les types I, J et K chez l'oie du Canada et le type L chez l'oie domestique (Bahirathan, Puente et Seyfried, 1998).

L'identification de l'origine de la contamination fécale peut se faire grâce aux bifidobactéries comme l'ont suggéré plusieurs chercheurs. En effet, Scardovi et al. (1971) ont remarqué que la mobilité électrophorétique de l'enzyme phosphokétolase fructose-6-phosphate variait selon la source de la souche et Mara et Oragui (1983) ont élaboré un nouveau milieu sélectif capable d'isoler les souches humaines de bifidobactéries fermentant le sorbitol. De plus, Gavini et al (1991) ont identifié 7 groupes phénotypiques de bifidobactéries. Les groupes I, III et VII, incapables de croître à 45°C dans du bouillon trypticase-phytone-levure, comprennent les souches humaines telles *B. bifidum*, *B. dentium*, *B. adolescentis* et *B. infantis* tandis que les groupes II, IV et V n'ont aucune difficulté à croître à 45°C et comprennent les souches animales (Gavini et al., 1991).

Le concept du profil de résistance (multiple) aux antibiotiques part de l'hypothèse que les souches de *E. coli*, de coliformes fécaux ou de streptocoques fécaux réagissent différemment aux antibiotiques selon leur origine (Malakoff, 2002). Il s'agit d'isoler les bactéries de l'eau, de les soumettre à l'action de divers antibiotiques et à analyser statistiquement leur résistance en fonction de leur source en comparant les résultats avec ceux faisant partie de la librairie conçue à partir d'isolats de fèces d'origine connue (Harwood, Whitlock et Withington, 2000; Hagedorn et al., 1999; Field, Bernhard et Brodeur, 2003; Malakoff, 2002). Cette méthode permet de classer correctement les microorganismes selon l'animal dont ils proviennent puisque Wiggins a réussi à discriminer les streptocoques fécaux de source humaine de ceux de source animale isolés d'un réservoir d'eau à Shenandoah County (Hagedorn et al., 1999).

Une autre façon d'identifier l'animal responsable de la contamination dans l'eau fait intervenir les bactériophages spécifiques d'hôte comme les phages de *Bacteroides fragilis* HSP40 (Dombek et al., 2000) spécifiques à l'humain et les coliphages F+. Les coliphages F+ à ADN et les 4 groupes de coliphages F+ à ARN sont particulièrement d'un grand intérêt : leurs pourcentages relatifs indiqueraient de quel animal ils proviennent. Les groupes de coliphages F+ à ADN et à ARN II et III sont plus abondants chez l'humain, ceux à ADN et à ARN I et IV chez le bœuf, ceux à ADN égalent ceux à

ARN I et III chez le porc et ceux à ARN I et IV chez les oies et les mouettes. Les coliphages sont d'abord isolés de l'échantillon d'eau comme mentionné dans la partie détection de la contamination fécale. Les coliphages F+ à ADN sont distinguables de ceux à ARN suite à l'incubation de diverses dilutions en présence d'hôtes bactériens croissant sur des milieux riches en nutriments contenant de la RNase. Le sérotypage des coliphages F+ à ARN se fait ensuite en mettant plusieurs dilutions sur des géloses de *E. coli* Famp contenant des antisérums neutralisés contre les coliphages MS2 (groupe I), GA (groupe II), QB (groupe III) ou SP (groupe IV) (Cole, Long et Sobsey, 2003).

Depuis 2003, une nouvelle méthode s'est ajoutée à toutes celles existant déjà. Elle a été élaborée par l'équipe d'Hagedorn et fait appel au système commercial Biolog qui est basé sur les profils d'utilisation des sources de carbone. Elle consiste à isoler les bactéries de l'eau sur un milieu m-Enterococcus et à transférer les colonies sur l'agar de croissance universel de Biolog. Une suspension liquide de la même turbidité que celle du standard est préparée et sert à inoculer une MicroPlate™ GP2 qui sera incubée à 37°C pendant 24 heures. Les résultats de 30 des 95 puits de la plaque sont lus pour déterminer l'espèce d'origine de la contamination (Hagedorn et al., 2003).

1.9.2) Méthodes biochimiques et chimiques

Ces méthodes excluent le ciblage de bactéries. Elles s'appuient plutôt sur des substances excrétées en même temps que les fèces. Les acides biliaires, c'est-à-dire l'acide déoxycholique et l'acide lithocholique, en font entre autres partie (Bitton, 1999).

Il y a aussi les stérols fécaux. Il s'agit des divers stérols comprenant du cholestane A-C27, C28 et C29 qu'il est possible de retrouver dans les matières fécales. Leur spécificité à la source est influencée par trois facteurs : la diète des animaux, puisque celle des omnivores, des herbivores et des carnivores ne contient pas les mêmes stérols, la biosynthèse possible de stérols par plusieurs animaux et la biohydrogénation des stérols en isomères de stanols de différentes configurations par les bactéries anaérobies du tractus digestif de certains animaux (Ha et Stenstrom, 2000). Le coprostanol est un stérol fécal qui se forme pendant le catabolisme du cholestérol par les bactéries indigènes des

intestins des humains et des mammifères supérieurs (Scott et al., 2002). Il est présent en quantité plus élevée dans les fèces humaines (Ha et Stenstrom, 2000) constituant environ 60% de leurs stanols totaux (Scott et al., 2002). De plus, chez les herbivores, les stérols C29 comme le 24-éthylcoprostanol et le 24-éthylcholestérol sont dominants. Une bonne façon de différencier les sources humaines des non-humaines est de calculer le ratio des concentrations de coprostanol sur le cholestanol : une valeur supérieure à 1 indique la présence de fèces humaines tandis qu'une valeur inférieure à 1 indique la présence de contamination animale. Pour arriver à concentrer les stanols particuliers, jusqu'à 10 litres d'eau doivent être filtrés au travers d'un filtre en fibre de verre. Les différents stanols sont ensuite identifiés par chromatographie gazeuse (Ha et Stenstrom, 2000).

Les composants des poudres nettoyantes peuvent également servir à identifier les sources humaines de contaminations fécales. Les alkylbenzènes à longues chaînes, par exemple, sont utilisés comme surfactants anioniques dans les détergents commerciaux. Puisqu'ils sont produits synthétiquement, leur présence est automatiquement reliée aux activités humaines (Ha et Stenstrom, 2000). Leur extraction se fait grâce à des solvants organiques et la chromatographie gazeuse permet leur concentration, leur séparation, leur détection ainsi que leur quantification. Quant aux agents blanchissants fluorescents, ils sont aussi extraits avec des solvants organiques, mais leur concentration et leur analyse requiert un fluorimètre. D'autres composants des poudres nettoyantes, les tripolyphosphates de sodium, sont isolés par chromatographie d'échange d'ions et sont hydrolysés en orthophosphates avant que leur concentration soit déterminée par les techniques standards des phosphates (Salter, 2002).

Une autre méthode envisagée pour s'assurer que la contamination fécale est d'origine humaine, est de procéder à la détection de la caféine dans l'eau. En effet, la caféine est excrétée dans l'urine des individus ayant consommé du café, du thé, des breuvages carbonés ou des produits pharmaceutiques (Ha et Stenstrom, 2000).

1.9.3) Méthodes immunologiques

D'autres méthodes cherchent à détecter les anticorps spécifiques d'espèces qui adhèrent aux bactéries excrétées dans les fèces (Malakoff, 2002). Les différents antigènes que possèdent les bactéries humaines et non-humaines à leur surface peuvent servir à les différencier. Des anticorps, auxquels des enzymes ou des colorants fluorescents ont été liés, s'y adhèrent et sont détectés et quantifiés à l'aide d'un appareil contenant un biosenseur ou d'un appareil de cytométrie en flux assisté d'un laser (Salter, 2002). La présence de divers antigènes somatiques O sur des *E. coli* peut être détectée de cette manière pour séparer les isolats humains des isolats d'animaux comme l'a fait Parveen et al. (Scott et al., 2002). La technique de capture des anticorps peut également se révéler utile (Salter, 2002).

1.9.4) Méthodes moléculaires

Depuis l'avènement de la biologie moléculaire, de nouvelles méthodes ont été mises au point. Elles constituent des alternatives intéressantes aux méthodes traditionnelles : contournant, dans certains cas, les biais potentiellement engendrés par la culture des microorganismes (Bernhard et al., 2003).

L'une de ces méthodes est le ribotypage. Dans le ribotypage, l'ADN génomique de *E. coli* subit un clivage par des endonucléases de restriction et des gènes codant pour les ARN ribosomiaux (ARNr) hautement conservés sont détectés grâce à des sondes d'oligonucléotides (Scott et al., 2002). Plus spécifiquement, *E. coli* doit être cultivé dans du bouillon nutritif (BHI) avant que son ADN soit extrait et digéré avec *HindIII* ou tout autre enzyme. Les fragments d'ADN doivent être séparés sur un gel d'agarose 1% reposant dans du tampon TBE et transférés sur une membrane de nylon. La membrane est ensuite hybridée avec un fragment *BamHI* du plasmide pKK3535 contenant les gènes d'ARNr 16S et 23S ayant été marqué avec de la digoxigénine-dUTP (Carson et al., 2001). Le développement de la membrane peut se faire par colorimétrie, par chémiluminescence ou par radioactivité. Il ne reste plus qu'à comparer les profils avec ceux de la banque de données afin d'identifier l'espèce d'origine (Scott et al., 2002).

Les réactions de polymérase en chaîne (PCR) d'éléments d'ADN répétitifs présents à divers endroits dans le génome procaryote représentent une autre méthode moléculaire de déterminer l'origine de la contamination fécale. Il en existe 3 types : le PCR utilisant des amorces ciblant les séquences palindromiques extragéniques répétées (REP-PCR), le PCR dont les amorces amplifient les séquences consensus intergéniques répétées d'enterobactéries (ERIC-PCR) et le PCR nécessitant une amorce détectant des éléments extragéniques répétés (BOX-PCR) (Scott et al., 2002). Dans l'étude faite par Dombek et al. (2000), le PCR d'éléments répétitifs avec l'amorce BOXA1R a donné de meilleurs résultats que celle faite avec les amorces REP1R et REP2I. En effet, les bandes générées par BOX-PCR, une fois comparées avec les profils d'une librairie de référence, permettent de relier la contamination à sa source (Scott et al., 2002).

Une autre approche est de cibler, chez les bactéries, des marqueurs moléculaires spécifiques qui permettraient de déterminer la source animale de la contamination (Scott et al., 2002). Pour différencier la pollution fécale humaine de la pollution fécale des ruminants, Bernhard et Field (2000) ont d'abord caractérisé les séquences d'ADNr 16S spécifiques d'hôte des membres du groupe *Bacteroides-Prevotella* et du genre *Bifidobacterium* par LH-PCR (length heterogeneity PCR) et T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism). Des amorces spécifiques ont ensuite été développées à partir des informations obtenues pour *Bacteroides-Prevotella* et des PCR ont été effectués sur l'ADN extrait des échantillons d'eau filtrés. Certaines de ces amorces ont permis de discriminer les bactéries provenant de l'humain de celles provenant des bovins (Field, Bernhard et Brodeur, 2003; Bernhard et al., 2003). De plus, Yamamoto et al. (1992) ont développé une méthode dans laquelle des sondes ciblant l'ARNr 16S sont utilisées pour identifier 5 espèces de bifidobactéries intestinales chez l'humain. L'hybridation *in situ* et l'hybridation de colonies ont quant à elles été testées par Langendijk et al. (1995) et Kaufmann et al. (1997) qui ont développé des sondes spécifiques à *Bifidobacterium*. Une autre approche est basée sur le fait que *Bifidobacterium dentium* est uniquement retrouvé chez l'humain. Elle consiste à extraire l'ADN de l'échantillon, à faire un PCR avec des amorces spécifiques aux bifidobactéries et à exécuter une hybridation ADN-ADN avec la sonde spécifique à l'espèce *dentium* (BDE) et la sonde spécifique aux animaux (BAN)

(Nebra, Bonjoch et Blanch, 2003). Cibler les gènes de toxines spécifiques d'hôtes constitue un autre moyen de parvenir à différencier les espèces responsables de la contamination fécale. Par exemple, pour identifier les bovins, Khatib et al. (2002) ont élaboré des amorces amplifiant une séquence spécifique au gène de la toxine LTIIa des *E. coli* entérotoxigénique. En outre, les divers fimbriae démontrant une spécificité d'hôte sont d'autres marqueurs moléculaires ayant montré leur potentiel par le passé (Scott et al., 2002).

L'électrophorèse en champ pulsé fait aussi partie des méthodes moléculaires. Son principe est simple : les empreintes d'ADN sont générées après que des endonucléases de restriction coupant rarement l'ADN génomique bactérien aient fait leur œuvre (Scott et al., 2002). Simmons et al. (2000) en a fait l'essai pour identifier la provenance des bactéries d'origine fécale à Four Mile Run. C'est ainsi qu'il a pu découvrir que les animaux sauvages, principalement les rats-laveurs, et les chiens étaient à l'origine du problème de pollution (Simmons et al., 2000).

Une méthode moléculaire capable d'identifier 4 groupes de phages F+ à ARN, le génotypage, constitue une alternative intéressante au sérotypage décrit précédemment dans les méthodes microbiologiques. Il s'agit de cultiver les phages sur leur hôte, de les transférer sur une membrane de nylon, de les dénaturer afin d'exposer leur ADN qui sera lié à la membrane et de détecter les différents groupes de phages en procédant à une hybridation de leur ADN avec des oligonucléotides marqués (Scott et al., 2002).

La détection de virus pathogènes pour les humains ou les bovins peut également se révéler fort utile dans la recherche de la source de la contamination fécale. Par exemple, l'ADN des virus entériques humains, qui sont associés avec le tractus gastro-intestinal, a été amplifié par Jiang et al. pour servir d'index de pollution d'origine humaine dans les eaux de la côte californienne (Scott et al., 2002). Les adénovirus peuvent aussi remplir cet objectif, il suffit de les détecter par PCR avec les amorces hexAA1885 et hexAA1913 (Ha et Stenstrom, 2000). Quant aux entérovirus bovins, leur utilité comme indicateur de contamination bovine n'est pas à dédaigner, puisqu'ils sont excrétés en très grand nombre

dans les fèces des animaux. D'ailleurs, en 2002, Ley et al. ont extrait l'ARN d'échantillons d'eau contenant ces virus et ont amplifié par RT-PCR les régions non-transcrites en 5' de leurs génomes.

Une dernière méthode, ayant pour objectif d'établir un lien entre la présence de matières fécales dans l'eau et l'animal les ayant produites, s'intéresse aux séquences semi-aléatoires et s'appelle l'analyse RAPD (random amplified polymorphic DNA). Elle permet d'obtenir, grâce à une PCR faisant intervenir une seule amorce de 8 à 12 pb, des profils d'amplification des génomes microbiens différents d'une souche à l'autre (Hagedorn et al., 1999).

1.10) Identification d'espèces dans d'autres domaines

Il n'y a pas que dans la gestion des ressources en eau qu'identifier l'espèce animale en cause est de mise. Cela peut également se révéler nécessaire pour identifier l'origine de certains échantillons biologiques (sang, sperme, salive, poils, os) recueillis lors d'enquêtes policières, pour procéder à l'inspection des aliments et pour confirmer la nature des lignées cellulaires en culture dans les laboratoires d'immunologie.

Les méthodes classiques utilisées en médecine légale sont basées sur l'identification des protéines que ce soit par précipitation avec un anticorps, par électrophorèse en 2 dimensions ou par des techniques d'agglutination (Bataille et al., 1999). Cependant, de nouvelles méthodes, basées sur les différences génétiques, sont apparues. Les satellites alpha et les répétitions Alu peuvent indiquer que l'ADN provient de primates tandis que les répétitions courtes en tandem et les autres répétitions en tandem en nombre variable sont reconnues pour être spécifiques aux humains (Bataille et al., 1999). Hershfield et al. (1994) ont développé une amorce $(CAC)_n$ capable de générer des profils différents pour chacun des vertébrés lorsque utilisée dans une réaction de PCR. L'amplification PCR ciblant le gène mitochondrial du cytochrome b des vertébrés suivi d'un séquençage fait aussi partie des approches envisagées (Parson et al., 2000; Bataille et al., 1999). Quant aux mammifères, ils peuvent, selon une étude faite par Soteriou et al. (1995), être identifiés en amplifiant par PCR la région non-transcrite en 3' du gène SON (codant pour

la « SON DNA binding protein », GeneID :6651 dans NCBI) qui est hautement conservé. L'amplification PCR interne avec des amorces élaborées à partir des régions conservées bordant une région variable de l'ARN ribosomal 28S amplifie des fragments dont le nombre et la taille respectifs sont spécifiques à une espèce en particulier (Naito et al., 1992). Finalement, l'analyse RAPD qui fait appel à une seule amorce de 10 pb peut également servir à identifier une espèce à partir d'échantillons biologiques (Lee et Chang, 1994).

Dans le domaine de l'alimentation, une des procédures en usage pour identifier les espèces entrant dans la composition de divers produits est l'analyse des fragments d'os de façon microscopique (Lahiff et al., 2001). L'étude des protéines par électrophorèse, par détermination des points isoélectriques, par ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assay) et par HPLC ainsi que l'étude des acides gras sont également employées (Bellagamba et al., 2001). Récemment, des techniques moléculaires basées sur l'amplification PCR, l'hybridation et le séquençage de séquences d'ADN ont démontré un grand potentiel d'identification des espèces d'origine dans les viandes crues et cuites et les os contenus dans certains repas (Lahiff et al., 2001; Bellagamba et al., 2001). Par exemple, les séquences non-codantes répétées, les éléments satellites et les éléments répétés très éloignés chez les mammifères (MIR) peuvent s'avérer de très bons marqueurs moléculaires spécifiques d'espèces (Bellagamba et al., 2001). De plus, l'amplification par PCR, ciblant entre autres le cytochrome b, combinée avec l'analyse RFLP peut aussi permettre l'identification des espèces dans la nourriture pour animaux et les autres produits carnés en vente (Bellagamba et al., 2001; Lahiff et al., 2001).

Les cultures cellulaires peuvent croître, être maintenues et être utilisées pendant des années sans aucune confirmation de leur espèce d'origine. Malgré le manque d'intérêt affiché par la communauté scientifique, quelques méthodes ont été mises au point pour pallier à cette aberration. Entre autres, l'analyse biochimique des polymorphismes des isoenzymes par électrophorèse, la karyologie, la transplantation, l'hémagglutination, l'immunofluorescence et le génotypage permettent de déterminer la contamination inter-espèce dans les lignées cellulaires (Parodi et al., 2002). Des méthodes basées sur le PCR

sont également disponibles. Elles font appel à des amorces ciblant alu, la β -globine, les séquences d'ADN ribosomal, le gène *coxI* et le cytochrome b. Des digestions avec des enzymes de restriction peuvent être effectuées pour confirmer les résultats des PCR (Parodi et al., 2002).

Toutes les méthodes moléculaires utilisées dans ces domaines ciblent les différences dans les ADN des animaux sans passer par des intermédiaires (bactéries, virus) comme le font toutes celles utilisées pour identifier les sources de contamination fécale. Il pourrait donc être profitable de s'en inspirer afin de mettre au point une nouvelle méthode. C'est ce que propose cette étude : puisque l'ADN mitochondrial et ribosomal semblent bien se prêter à la différenciation inter-espèces, leur amplification a été envisagée.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1) Échantillons

Les échantillons de tissus (poumons de porc et de bœuf, intestins de mouton) et de fèces (de porc, de bœuf et de mouton) ont été fournis par la collection de tissus à l'INRS-Institut Armand-Frappier. De l'ADN humain, extrait d'un échantillon de sang de R. Villemur par le service d'histocompatibilité de l'INRS-Institut Armand-Frappier pour les fins d'une autre étude, a été obtenu avec la permission de R. Villemur. De plus, un volontaire du laboratoire de R. Villemur a gentiment accepté de donner un échantillon de ses fèces. Des cellules humaines HRT-18 ont quant à elles été gracieusement fournies par Mme Francine Lambert du laboratoire du Dr Pierre Talbot.

Les échantillons d'eau usée, que ce soit l'affluent, l'eau sortant des traitements physico-chimiques ou l'effluent, ont été prélevés à la station d'épuration de Fabreville (Ville de Laval, Québec, Canada). De l'eau de ruissellement a été récoltée dans les drains souterrains d'un champ de maïs, situé à St-Lambert-de-Lauzon (Québec, Canada), le lendemain d'un épandage de fumier de bovins, et dans les fosses d'une ferme laitière de St-Placide (Québec, Canada). Du lisier de porc provenant d'une porcherie a été fourni par M. Louis Racine à l'état brut ou après avoir subi un traitement dans un bioréacteur thermophile tel que décrit par Juteau et al. (2004). Deux rivières ont également été échantillonnées : la rivière Assomption à la hauteur de Repentigny et la rivière des Mille-Îles depuis l'Île Bélair (Québec, Canada).

2.2) Extraction d'ADN

- i) L'ADN humain a été extrait à partir de cellules du côlon cancéreuses appartenant à la lignée cellulaire HRT-18 en suivant une procédure dérivée d'une méthode originalement décrite par Blin et Stafford en 1976. Il s'agit de laver les cellules en culture avec une solution saline tamponnée au phosphate

1X à pH 7.2 (le PBS contient du NaCl 130 mM, du Na_2HPO_4 7 mM et du $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3 mM) et de les conserver à -20°C en attendant d'en avoir besoin. Puis, il faut ajouter du tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 M, SDS 0.5% (p/v) et RNase libre de Dnases 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) ajoutée à la dernière minute) aux cellules congelées et incubé une heure à 37°C . Les cellules ont été grattées à l'aide d'un « policeman » et incubées trois heures à 50°C avec de la protéinase K (Sigma-Aldrich) à une concentration finale de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Trois extractions au phénol (tamponné avec du Tris-HCl à pH 8.0) suivies d'une extraction au chloroforme/alcool isoamylique ont été effectuées avant que la précipitation de l'ADN, nécessitant de l'acétate d'ammonium et de l'éthanol, ne soit faite (Sambrook, MacCallum et Russell, 2001). Finalement, l'ADN a été lavé deux fois avec de l'éthanol 70% et dissous dans l'eau.

- ii) L'extraction d'ADN à partir d'organes provenant d'animaux s'est faite de la manière suivante : les poumons de porc, les poumons de bœuf et les intestins de moutons ont dû être homogénéisés dans du tampon de lyse (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM et NaCl 100 mM) à l'aide d'un homogénéisateur à main (potter). Puis, du SDS et de la protéinase K ont été ajoutés aux homogénats à des concentrations finales de 0.1% (p/v) et de 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivement. Après trois heures d'incubation à 55°C , une courte période d'incubation (~15 minutes) à température pièce (~ 25°C) avec 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNase libre de Dnases s'est révélée nécessaire. Ensuite, deux extractions au phénol et une extraction au chloroforme/alcool isoamylique ont été effectuées. L'ADN a été précipité avec un dixième de volume d'acétate de sodium 3 M et deux volumes d'éthanol, et a été recueilli avec une pipette Pasteur recourbée avant d'être dissous dans l'eau.
- iii) Des ADNs humains, ovins, bovins et porcins ont également été extraits à partir de fèces congelées. Dans ce cas, la lyse des cellules a été faite en broyant les fèces (~0.5 ml) deux fois vingt secondes dans l'homogénéisateur

FastPrep FP120 (Thermosavant, Qbiogene, Carlsbad, CA) en présence d'un volume égal de tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM et SDS 0,5% (p/v)) et de 250 mg de billes de verre ayant des diamètres situés entre 0,45 et 0,50 mm. Les homogénats ont ensuite été centrifugés dix minutes à 16000Xg. Les surnageants ont été recueillis et de la RNase libre de DNases leur a été ajoutée. Après dix minutes d'incubation à température pièce, une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique puis une extraction au chloroforme/alcool isoamylique ont été effectuées. L'ADN contenu dans la phase aqueuse a été précipité à -20°C avec deux volumes d'éthanol. Après une demi-heure, l'ADN, centrifugé à 16000Xg pendant 15 min, a été lavé avec de l'éthanol 70% et dissout dans l'eau.

- iv) Les échantillons d'eaux usées ont d'abord été filtrés sous vide avec un papier filtre (Whatman #41). Les filtrats ont ensuite été centrifugés 15 minutes à 9110Xg dans une centrifugeuse Beckman AvantiTM J-25 contenant le rotor JLA-10.5 pour concentrer la matière. L'ADN de la matière récoltée sur les papiers filtres et dans les culots des bouteilles centrifugées a été extrait de la même façon que pour les fèces.
- v) L'ADN du lisier de porc brut et traité a été extrait comme décrit pour les fèces sauf que le tampon de lyse utilisé contenait 100 mM d'EDTA au lieu de 10 mM.
- vi) L'extraction de l'ADN de 350 mL d'eau provenant des drains souterrains d'une ferme de St-Lambert de Lauzon et de 1.5 litre d'eau des fosses d'une ferme située à St-Placide a été effectuée comme mentionné en iii).
- vii) Entre 6 et 10 litres d'eau de rivière ont été centrifugés 15 minutes à 9110Xg. L'ADN a été extrait des culots obtenus de la même manière que pour les fèces. Dans ce cas, une étape de purification supplémentaire a été requise afin d'éliminer les inhibiteurs de Taq polymérase à ADN présents dans l'ADN : un

passage dans une colonne de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (Berthelet, Whyte et Greer, 1996). La colonne de PVPP était constituée d'une seringue de 1ml, dont le piston a été retiré et dont l'extrémité a été bloquée avec des morceaux de papier essuie-tout (Kimwipe). Celle-ci a été placée au-dessus d'un tube sans couvercle 1,5 ml contenu dans un tube de 15 ml. La colonne a été remplie avec 0,5 ml de PVPP lavé à l'acide et équilibré avec du tampon phosphate de potassium 20 mM à pH 7,4. L'ADN a été déposé à la surface de la colonne et celle-ci a été centrifugée deux minutes à 1000Xg. L'ADN a été recueilli dans le tube de 1.5 ml tandis que les impuretés sont restées dans la colonne.

Dans tous les cas, la densité optique d'une cuvette de quartz contenant 20 µl d'ADN et 780 µl d'eau a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre et la concentration d'ADN (en ng/µl) déterminée grâce à la formule : [(densité optique à 260 nm – densité optique à 280 nm) X 40] X 100.

2.3) Élaboration des amorces

Les séquences d'ADN mitochondrial de l'humain, du mouton, du bœuf, du porc et du poulet (numéros d'accès dans GenBank : J01415, AF010406, J01394, AF034253 et AY235570, respectivement) ont été alignées à l'aide du programme Clustal W. Pour tester leur spécificité *in silico*, les régions présentant le plus haut degré de différence avec les autres séquences ont été comparées aux séquences nucléiques présentes dans des banques de données avec le programme BLASTN. Pour chaque espèce, une paire d'amorces spécifiques amplifiant une séquence de longueur différente (voir le Tableau 2 dans le chapitre des résultats) a été sélectionnée afin de permettre son utilisation dans les protocoles de PCR simple et multiplex. D'autres oligonucléotides ont été élaborés pour satisfaire aux besoins du PCR interne (voir le Tableau 2 dans le chapitre Résultats). Il a suffi d'aligner les séquences mitochondriales ciblées par les amorces précédentes et de sélectionner des régions spécifiques d'espèces amplifiant des séquences de longueur différente pour chaque espèce.

Puisque les séquences d'ADN ribosomal 28S du mouton, du bœuf et du porc, n'étaient pas encore disponibles, il était impossible de procéder comme avec les gènes mitochondriaux pour trouver des amorces spécifiques d'espèces. Il a plutôt fallu se concentrer sur les régions variables bordées de régions conservées chez toutes les espèces jusqu'ici complètement séquencées. Les séquences d'ADNr 28S de l'humain, de *Xenopus laevis*, de la souris, du rat et de la drosophile (numéros d'accès : M1167, X02995, X00525, V01270, et M21017, respectivement) ont donc été prises dans la banque de données GenBank pour être alignées grâce au programme Clustal W du logiciel BioEdit. C'est ainsi que deux amorces conservées bordant une séquence dont la longueur varie selon l'espèce ont été sélectionnées (voir le Tableau 2 dans le chapitre Résultats).

2.4) L'amplification PCR

Chaque réaction de polymérase en chaîne (PCR), dont le volume était de 50 μ l, contenait du tampon PCR (KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM et Tris-HCl 10 mM à pH 9), 200 μ M de chaque dNTP, de 0.2 pmol/ μ l de chaque amorce, 0.05 U/ μ l de Taq polymérase, 0.5 μ g/ μ l de BSA et différentes quantités d'ADN dépendant de l'expérience. Avant de débiter l'amplification dans un appareil Perkins Elmer 480, le tout devait être recouvert de 40 μ l d'huile minérale. Les conditions de l'amplification étaient les suivantes : une dénaturation de 94°C pendant 5 min, suivie d'une période d'appariement de 5 min à 55°C, 35 cycles de 72°C 2 min, 94°C 40 secondes et 55°C 1 min et finalement une étape d'élongation de 10 min à 72°C. Les amplifications de PCR multiplex ont été effectuées de la même manière sauf que le mélange réactionnel comprenait les paires d'amorces des quatre espèces en même temps. Quant aux amplifications de PCR internes, elles ont été exécutées de façon similaire bien qu'elles aient nécessité des paires d'amorces internes et que 1 μ l de produit PCR de la première réaction ait été ajouté au lieu de l'ADN extrait.

2.5) L'électrophorèse

Afin de visualiser les produits amplifiés, il a fallu les faire migrer dans un gel contenant 1% ou 1.5% d'agarose selon le type de PCR préalablement effectué. Quinze μ l de produits obtenus par PCR auxquels 3 μ l de tampon de chargement ont été ajoutés et 5 μ l

de marqueurs de poids moléculaire ont été déposés dans chacun des puits du gel immergé dans du tampon TAE 1X (EDTA 1 mM, acide acétique glacial 0.1% et Tris-HCl 31 mM à pH 8). Après environ une heure de migration à 80 V, l'électrophorèse a été arrêtée et le gel trempé dans du bromure d'éthidium (0.5 µg/ml) pendant 15 minutes sous agitation. Après un rinçage du gel pendant 5 min dans l'eau, l'ADN a été révélé sous U.V. à l'aide de l'appareil Gel Doc 1000 de Bio-Rad.

2.6) Digestion enzymatique

Les réactions de digestion enzymatique ont été effectuées selon les recommandations des fabricants (Amersham Pharmacia Biotech pour *TaqI*, *BglIII*, *HhaI*, *NdeI* et *StuI*; Promega pour *StyI*; New England BioLabs Inc. pour *BstBI*). Dans tous les cas, 10 µl d'ADN ont été soumis à une digestion par 8-20 unités d'enzyme de restriction. Les mélanges réactionnels impliquant les enzymes *StuI* et *TaqI* comprenaient 2 µl de tampon OPA+10X (100 mM de Tris-acétate (pH 7.5), 100 mM d'acétate de magnésium et 500 mM d'acétate de potassium) et 8 µl d'eau (celui de *TaqI* a dû en plus être recouvert de 20 µl d'huile minérale). Celui de l'enzyme *BstBI* comprenait 2 µl de tampon NE4 (50 mM d'acétate de potassium, 20 mM de tris-acétate, 10 mM d'acétate de magnésium, 1 mM de DTT pH 7.9 à 25°C) et 8 µl d'eau, alors que celui de l'enzyme *StyI* comprenait 2 µl de tampon React3 (50 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM de MgCl₂ et 100 mM de NaCl) et 8 µl d'eau. Quant aux mélanges réactionnels des enzymes *HhaI*, *NdeI* et *BglIII*, ils contenaient tous 4 µl de tampon OPA+10X et 6 µl d'eau. La réaction des enzymes *StuI*, *HhaI*, *NdeI*, *BglIII* et *StyI* a eu lieu dans un bain à 37°C pendant une heure, tandis que celle des enzymes *TaqI* et *BstBI* a eu lieu dans une chauffe-module à 65°C dans le même laps de temps. L'inhibition de la réaction des enzymes *HhaI* et *NdeI* a pris 20 minutes à 65°C et celle de *StyI* seulement 10 minutes. Les digestions par *StuI*, *TaqI* et *BglIII* ont cessé après 30 minutes à 85°C.

Chapitre 3 : Résultats

Ce projet consistait à développer une méthode moléculaire permettant la différenciation des espèces à l'origine de la contamination fécale. Pour ce faire, des amorces ont été élaborées, les conditions du PCR ont été optimisées et divers tests ont été effectués avant de passer aux analyses en tant que tel. Les sections suivantes font état des résultats obtenus dans chaque cas.

3.1) Amorces

L'amplification PCR s'est imposée comme étant la méthode de choix pour différencier les espèces animales à l'étude (l'humain, le mouton, le bœuf et le porc). Des séquences spécifiques d'ADN mitochondrial et d'ADN ribosomal 28S ont été choisies comme cibles géniques. Comme aucune amorce adéquate n'existait, il a fallu en élaborer. La conception des amorces s'est faite de la manière suivante : des séquences d'ADN ont été alignées (voir l'Appendice A), des régions ont été sélectionnées et leur spécificité a été vérifiée dans une banque de données (voir le chapitre matériel et méthodes). Le Tableau 2 présenté ci-dessous contient toutes les amorces testées.

Tableau 2 : Liste des amorces pour PCR et PCR internes.

Espèce	Cible	Amorces	Amplicon
Humain	NADH déhydrogénase sous-unité 1, 16S, T-leu	Humito1-G 5'-GCCTGCGTCAGATTAACACTGAA-3' Humito1-D 5'-GTTCATAGTAGAAGAGCGATGGTG-3'	1227 pb
	NADH déhydrogénase sous-unité 5	Humito2-G 5'-AGCCCTTCTAAACGCTAATCCAAGCCT-3' Humito2-D 5'-CTTGTCAGGGAGGTAGCGATGAGA-3'	659 pb
		Humito11-G 5'-CCACTACTAGGCCTCCTCCTA-3' Humito11-D 5'-TAGCGATGAGAGTAATAGATAGGG-3'	612 pb
Mouton	NADH déhydrogénase sous-unité 5	Ovmito1-G 5'-GACAACCCCGATTTCCAACCCTCAT-3' Ovmito1-D 5'-GTAAGGTTGTACTAATGAGGATCGTG-3'	506 pb

		Ovmito11-G 5'-CAATGAAAATAACCCGTTCTAAT-3' Ovmito11-D 5'-TGTACTAATGAGGATCGTGATTAG-3'	468 pb
Bœuf	NADH déhydrogénase sous-unité 5	Bomito1-G 5'-ACATACCCTTGATTGGACTAGCAT-3' Bomito1-D 5'-CTTGAAGGCGTTTGAGGGGTAGTGAT-3'	934 pb
		Bomito11-G 5'-GATTGGACTAGCATTAGCTGCAACC-3' Bomito11-D 5'-GTAAGCGTTTGATAGAGTTGATCAGA-3'	733 pb
Porc	16S, T-leu	Pomito1-G 5'-ACCAACCTCACAAACGCGTCTCAG-3' Pomito1-D 5'-CTAGTATGGTTCGGACACTACTG-3'	1388 pb
	NADH déhydrogénase sous-unité 1	Pomito2-G 5'-CAGTAATGTCCGGAACCATACTAG-3' Pomito2-D 5'-TAGTAACAGTAGGCCTGCTTGTAGT-3'	358 pb
	Cytochrome c oxidase sous-unité 2, tRNA-Lys, ATP synthase FO sous-unités 6 et 8	Pomito3-G 5'-GGCCACATTAGCACTACTCAACATC-3' Pomito3-D 5'-AGATCCGATGATTACGTGCAAC-3'	788 pb
		Pomito11-G 5'-CTCTATACTCTTACTATCTCTAGGAC-3' Pomito11-D 5'-ATACGCCTAGTGCAATGGTGATGGA-3'	400 pb
Toutes	ADNr 28S	Ribo28S-G 5'-AACTTCGGGATAAGGATTGGCTCT-3' Ribo28S-D 5'-GAGCACTGGGCAGAAATCACAT-3'	inconnu

Chaque paire d'amorces ciblant l'ADN mitochondrial n'a généré qu'une seule bande ayant la longueur attendue lorsque mise en présence de l'ADN génomique extrait de l'espèce correspondante. Pour l'humain et le porc, plus d'une paire d'amorces ont été testées lors des PCR, car les amorces Humito1 et Pomito1 amplifiaient des fragments d'ADN en moindre quantité que les autres amorces. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les amorces Humito2 et Pomito3. La figure 1 illustre la ségrégation des ADN amplifiés suite à des PCR simples (avec uniquement l'ADN génomique d'une espèce et la paire d'amorces correspondante) ou suite à des PCR multiplex (où les ADN génomiques des 4 espèces ainsi que les paires d'amorces spécifiques à chaque espèce étaient présents dans le mélange réactionnel du PCR). Le panneau A montre le premier essai avec les amorces Humito1, Ovmito1, Bomito1 et Pomito1. Les bandes générées par ces amorces présentaient une intensité inégale, c'est pourquoi d'autres essais ont été effectués en remplaçant Pomito1 par Pomito2 ou Pomito3 (Fig. 1 B). Bien que le

multiplex PCR avec Pomito3 semblait régler le problème d'intensité des bandes, ce n'est qu'avec les amorces Humito2, Ovmito1, Bomito1 et Pomito3, que les bandes étaient véritablement d'intensités similaires (Fig. 1 C et D). De plus, les fragments d'ADN produits par ces amorces se différencient bien l'un de l'autre lors de l'électrophorèse. En effet, ceux-ci migrent de manière à ce que l'écart qui les sépare soit à peu près égal. De plus, elles ne produisent que très peu voire aucune amplification non-spécifique et aucune amplification croisée des ADN d'autres espèces par les amorces ciblant spécifiquement une espèce n'a été observée. Quant aux amorces Ribo28S, elles ont amplifié plusieurs bandes (~ 4 à 8) peu intenses chez chaque espèce (Fig. 2). La stratégie visant les gènes 28S ribosomiaux a donc été abandonnée ne produisant pas de résultats reproductibles et intéressants.

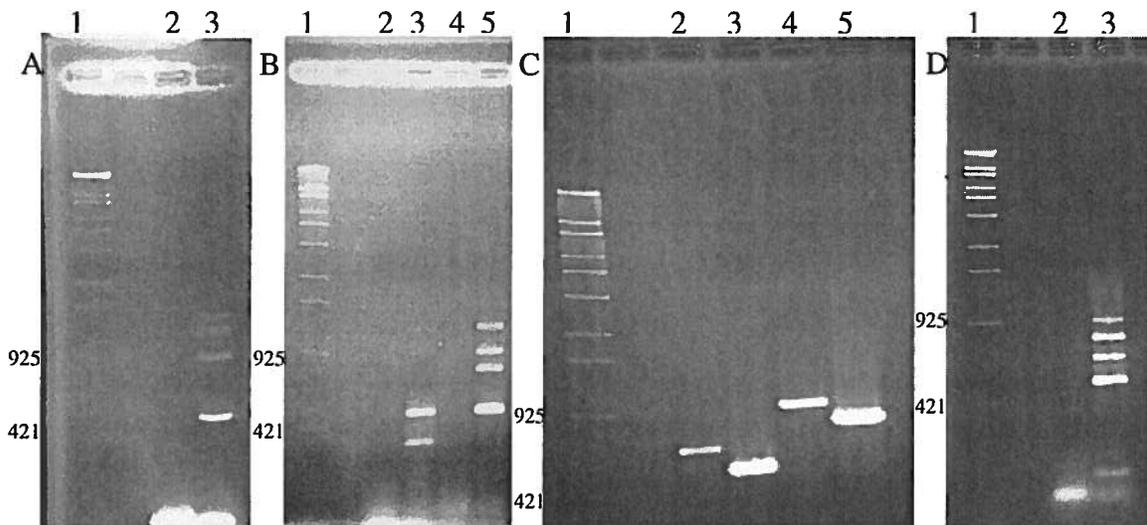


Figure 1 : Amplifications PCR de l'ADN mitochondrial à partir de l'ADN génomique (10 ng) extrait des 4 espèces animales avec les différentes amorces spécifiques. **A)** Puits 2 : le contrôle négatif, Puits 3 : Multiplex PCR avec les amorces Humito1, Ovmito1, Bomito1 et Pomito1. **B)** Puits 2 et 4 : les contrôles négatifs, Puits 3 : Multiplex PCR avec les amorces Humito1, Ovmito1, Bomito1 et Pomito2, Puits 5 : Multiplex PCR avec les amorces Humito1, Ovmito1, Bomito1 et Pomito3. **C)** Puits 2 : PCR avec de l'ADN humain et les amorces Humito2, Puits 3 : PCR avec l'ADN ovin et les amorces Ovmito1, Puits 4 : PCR avec l'ADN bovin et les amorces Bomito1, Puits 5 : PCR avec l'ADN porcine et les amorces Pomito3. **D)** Puits 2 : le contrôle négatif, Puits 3 : Multiplex PCR

avec les amorces Humito2, Pomito3, Ovmito1 et Bomito1. Les puits 1 correspondent au marqueur de poids moléculaire λ Sty.

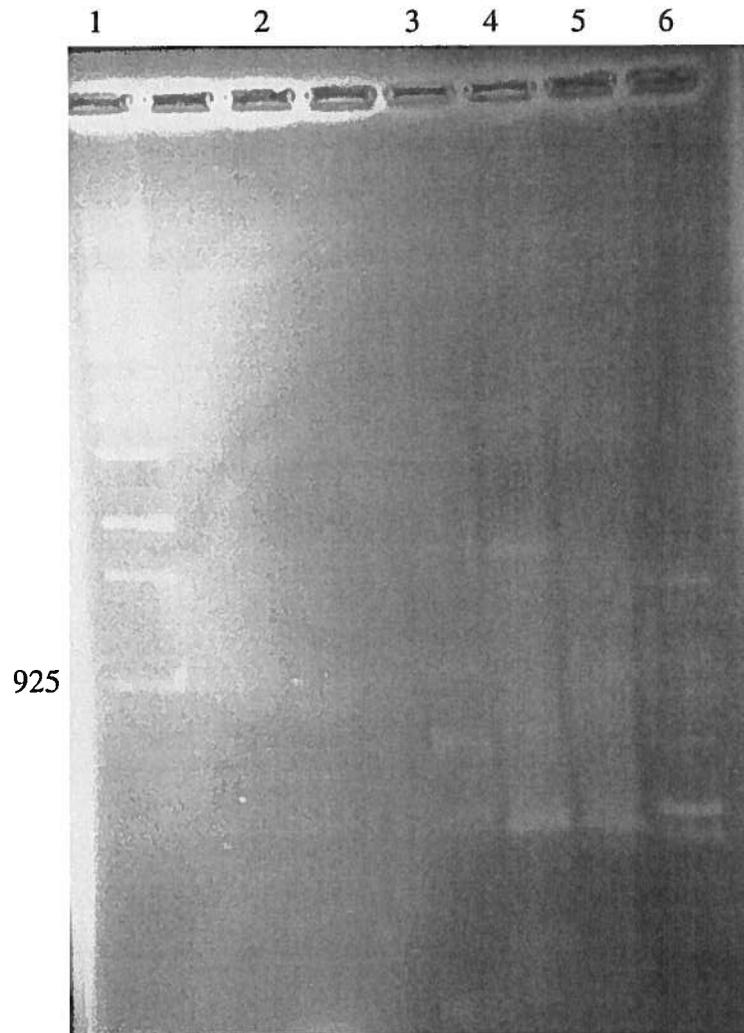


Figure 2 : Amplifications PCR de l'ADN ribosomal 28S à partir de l'ADN génomique extrait de l'humain (3), du mouton (4), du bœuf (5) et du porc (6). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire λ Sty, Puits 2 : le contrôle négatif.

3.2) Concentration de BSA

Plusieurs concentrations (0.2 à 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de BSA « bovine serum albumin » ont été ajoutées au mélange réactionnel de la réaction de PCR afin de déterminer celle qui améliore le plus l'amplification. Il est possible de constater sur la figure 3 que l'ajout de

0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BSA a permis de mieux visualiser les bandes de plus haut poids moléculaire, en particulier celle du porc.

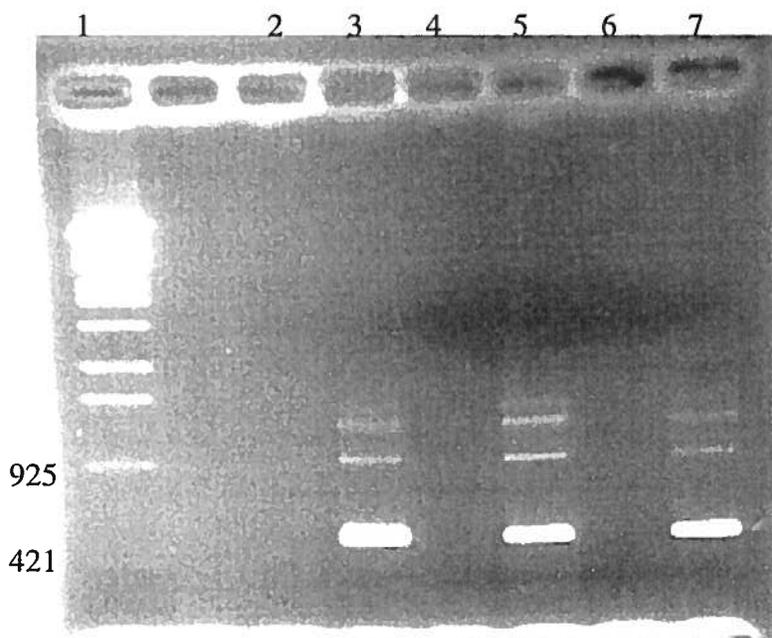


Figure 3 : Multiplex PCR (avec les amorces Humito1, Ovmito1, Bomito1 et Pomito1) en présence de différentes concentrations de BSA. Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire λSty , Puits 2, 4 et 6 : les contrôles négatifs. Amplification avec 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (3), 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (5) et 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (7) de BSA.

3.3) Température d'hybridation

Pour vérifier quelle température d'hybridation était la meilleure, des multiplex PCR ont été effectués avec un appareil du modèle Biométra[®] TGradient. Cet appareil a permis de tester en une seule fois douze températures d'hybridation situées entre 50°C et 60°C. La température optimale obtenue a été de 55.6°C, puisque qu'il y a eu présence d'une bande non-spécifique de 50°C à 54.4°C et que 2 des 4 bandes étaient moins visibles de 50°C à 52°C et de 56.8°C à 60°C (Fig. 4).

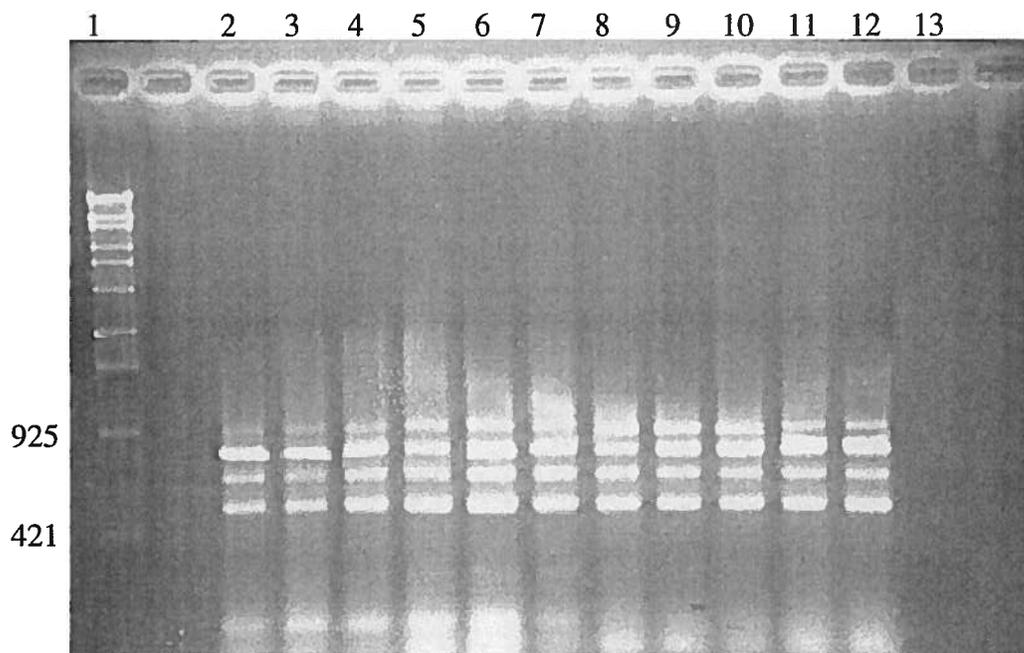


Figure 4 : Multiplex PCR avec des températures d'hybridation différentes. amplifications ont été effectués à 50°C (2), 50.2°C (3), 50.9°C (4), 52°C (5), 53.2°C (6), 54.4°C (7), 55.6°C (8), 56.8°C (9), 57.9°C (10), 59°C (11), 59.7°C (12) et 60°C (13). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire λ Sty.

3.4) Validation des produits de PCR

Afin de s'assurer que les bandes générées lors des amplifications avec les amorces correspondaient bien aux séquences ciblées, c'est-à-dire que leur longueur ne soit pas uniquement due à une coïncidence, chacun des amplicons a été soumis à deux digestions enzymatiques. Pour ce faire, des enzymes ont été choisies en fonction des sites de restriction présents dans les séquences disponibles dans les banques de données. Une migration sur un gel d'agarose 1.5% a permis de visualiser les différentes bandes obtenues (Fig. 5). Le profil des bandes obtenu était conforme aux prédictions (Tableau 3) ce qui suggère fortement que les produits de PCR sont véritablement ceux voulus.

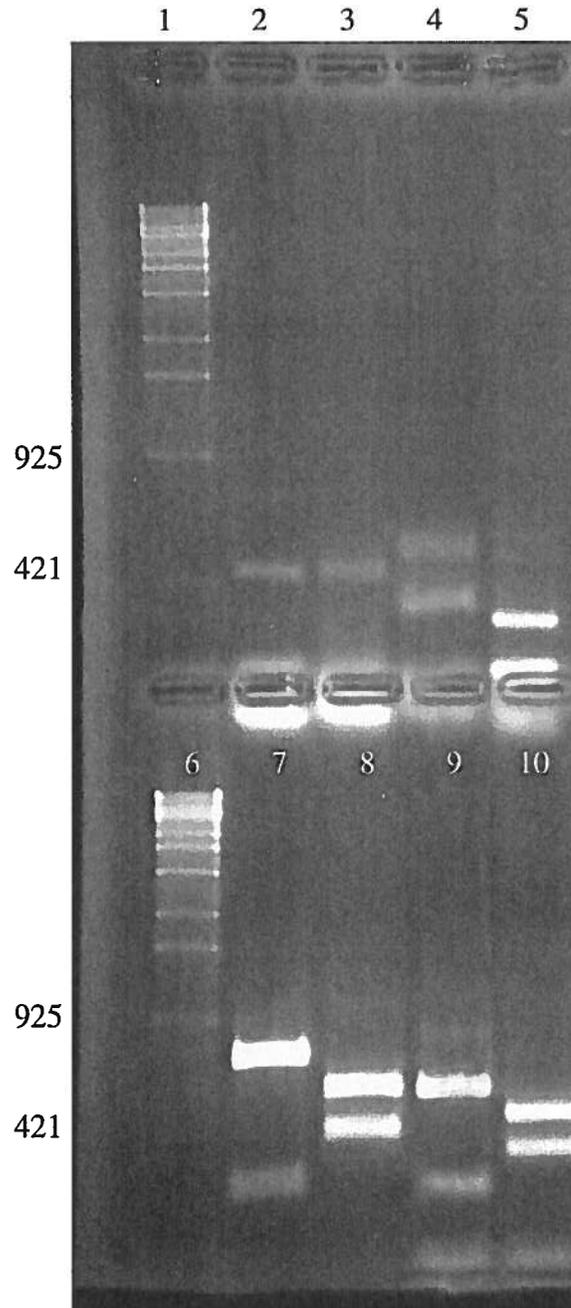


Figure 5 : Digestion enzymatique des produits des PCR exécutés avec les amorces définitives. Digestion de la bande humaine avec *Bst*BI (2) et *Taq*I (3), digestion de la bande ovine avec *Bgl*II (4) et *Sty*I (5), digestion de la bande bovine avec *Hha*I (7) et *Nde*I (8), digestion de la bande porcine avec *Stu*I (9) et *Taq*I (10). Puits 1 et 6: le marqueur de poids moléculaire λ Sty.

Tableau 3 : Fragments de restriction obtenus après digestion des produits de PCR

Espèce	Enzyme	Nb de fragments	Longueur des fragments prédits (pb)
Humain	<i>BstBI</i>	2	466, 191
	<i>TaqI</i>	3	466, 119, 72
Mouton	<i>BglIII</i>	2	362, 145
	<i>StyI</i>	2	319, 188
Boeuf	<i>HhaI</i>	2	689, 246
	<i>NdeI</i>	2	542, 393
Porc	<i>StuI</i>	2	547, 242
	<i>TaqI</i>	2	450, 339

3.5) Tests de sensibilité

Des tests de sensibilité ont été exécutés pour chaque paire d'amorces en amplifiant différentes quantités d'ADN (10000 pg, 1000 pg, 500 pg, 10 pg, 1 pg et 0.1 pg) de l'espèce correspondante. Pour mieux imiter les échantillons environnementaux, les mêmes expériences ont été faites, mais en ajoutant à chaque réaction 100 ng d'ADN bactérien (les résultats des électrophorèses sont montrés à l'appendice B). Le Tableau 4 compile les résultats obtenus. Les limites de sensibilité des PCR simples se situaient entre 500 pg et 1 pg d'ADN tandis que celles des PCR internes se situaient entre 1 pg et 0.1 pg d'ADN. Lorsqu'il y avait présence d'ADN bactérien, les limites de sensibilité des PCR simples étaient toutes de 500 pg d'ADN, alors que celles des PCR internes se situaient entre 1 pg et 0.1 pg d'ADN. Dans tous les cas, à l'exception de celui du porc en absence d'ADN bactérien, les PCR internes étaient plus sensibles que les PCR simples. De plus, en comparant les résultats, il a été possible de constater que la présence d'ADN bactérien n'affecte pas grandement la sensibilité des amplifications.

Tableau 4 : Limites de sensibilité des amplifications pour chaque espèce.

espèces	Succès de l'amplification avec:					
	10000pg	1000pg	500pg	10pg	1pg	0,1pg
Humain	+ + + +	+ + + +	+ + + +	- - + +	- - + +	- - + +
Mouton	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ - + +	- - + +	- - + +
Boeuf	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ - + +	+ - + +	- - + +
Porc	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ - + +	+ - + +	- - - -
4	+ + + +	+ + + +	+ + + +	- - + +	- - + +	- - + -

■ PCR ■ PCR + ADN bactérien ■ PCR interne ■ PCR interne + ADN bactérien

3.6) Essais d'amplification de l'ADN provenant de fèces

Avant de procéder aux essais avec de l'eau, il fallait vérifier s'il était possible d'amplifier l'ADN mitochondrial des cellules épithéliales excrétées dans les fèces. L'amplification PCR de l'ADN extrait de fèces animales avec les amorces spécifiques a permis de détecter avec succès chaque espèce (voir la Figure 6). Point à noter, 400 ng d'ADN ont été requis pour arriver à ce résultat. Pour ce qui est du multiplex PCR, une optimisation s'est révélée nécessaire afin de pouvoir obtenir 4 bandes d'intensité similaire. En effet, différentes quantités de chaque amorce et de chaque ADN ont été testées avant d'établir les conditions optimales : 400 ng d'ADN humain et porcin, 200 ng d'ADN ovin et bovin, 0.2 pmol de Pomito3, 0.4 pmol de Humito2 ainsi que 0.1 pmol de Bomito1 et Ovmito1 (voir la Figure 7).

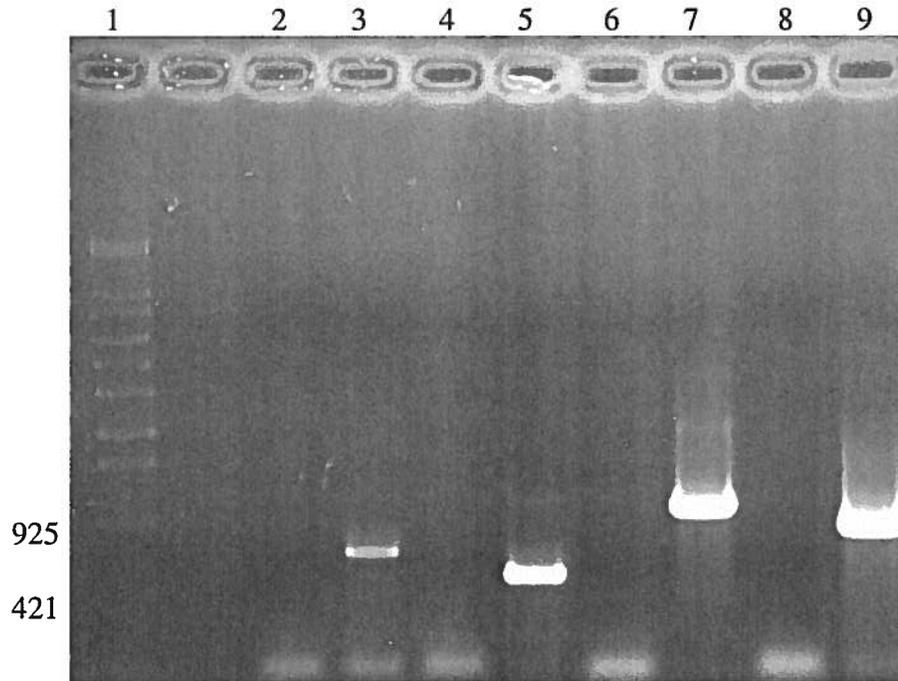


Figure 6 : Amplification PCR des ADN de fèces. Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire λ Sty, Puits 2, 4, 6 et 8 : les contrôles négatifs. Puits 3 : PCR avec l'ADN de fèces humaines et Humito2, Puits 5 : PCR avec l'ADN de fèces de mouton et Ovmito1, Puits 7 : PCR avec l'ADN de fèces de bœuf et Bomito1 et Puits 9 : PCR avec l'ADN de porc et Pomito3.

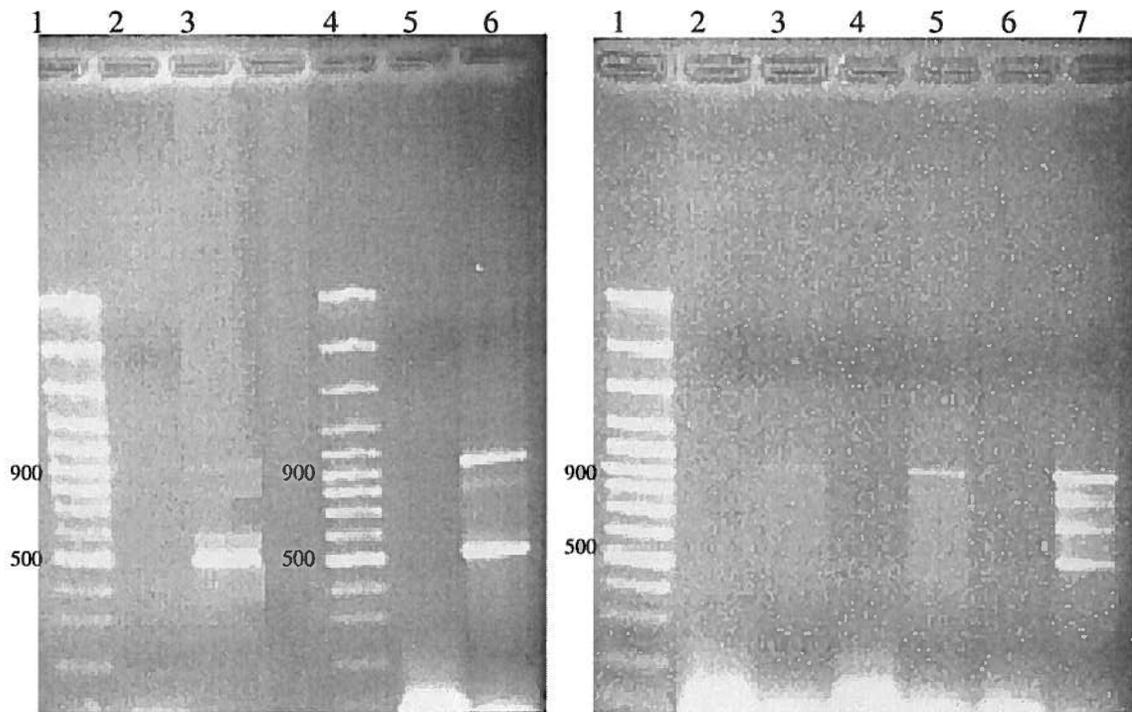


Figure 7: Optimisation du multiplex PCR d'un mélange d'ADN de fèces. **A)** Multiplex PCR dans 2 conditions. Puits 1 et 4 : le marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 100 pb DNA ladder Plus, Puits 2 et 5 : les contrôles négatifs, Puits 3 : multiplex PCR du mélange contenant 400 ng d'ADN de fèces d'humain et de porc ainsi que 200 ng d'ADN de fèces de bœuf et de mouton. Puits 6 : multiplex PCR avec 0.2 pmol de Pomito3, 0.4 pmol de Humito2, 0.1 pmol de Bomito1 et de Ovmito1. **B)** Multiplex PCR dans 3 conditions. Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 100 pb DNA ladder Plus, Puits 2, 4 et 6 : les contrôles négatifs, Puits 3 : multiplex PCR du mélange contenant 400 ng d'ADN de fèces d'humain et de porc ainsi que 200 ng d'ADN de bœuf et de mouton avec 0.2 pmol de Pomito3, 0.1 pmol de Bomito1, 0.4 pmol de Humito2 et 0.05 pmol de Ovmito1. Puits 5 : multiplex PCR avec 0.2 pmol de Pomito3, 0.1 pmol de Bomito1, 0.4 pmol de Humito2 et 0.05 pmol de Ovmito1. Puits 7 : multiplex PCR du mélange contenant 400 ng d'ADN de fèces d'humain et de porc, 200 ng d'ADN de fèces de bœuf et de mouton avec 0.2 pmol de Pomito3, 0.1 pmol de Bomito1 et de Ovmito1, 0.4 pmol de Humito2.

Un autre test a été effectué avec l'ADN extrait de fèces d'un individu ayant consommé du bœuf, du porc et du poulet pendant les heures précédant l'échantillonnage. Seul l'ADN humain a été amplifié par PCR et multiplex PCR (voir la Figure 8).

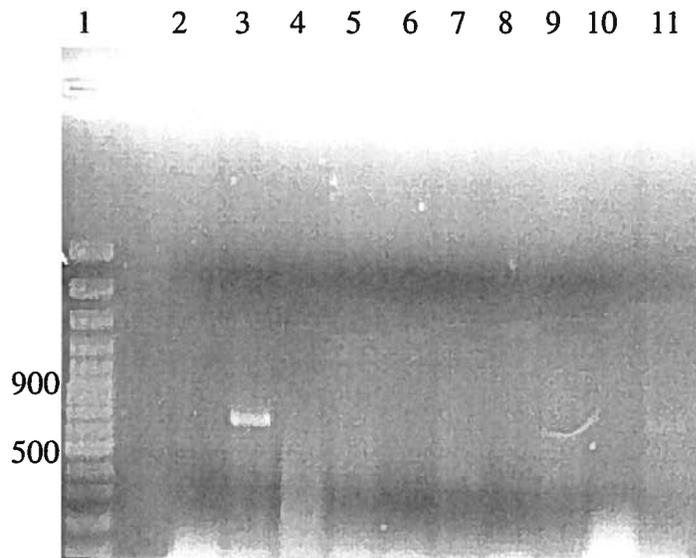


Figure 8 : PCR et multiplex PCR de 400 ng d'ADN de fèces humaines. PCR avec Humito2 (3), Ovmito1 (5), Bomito1 (7), Pomito3 (9) et multiplex PCR (11). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Plus, Puits 2, 4, 6, 8 et 10 : les contrôles négatifs.

3.7) Essais d'amplification de l'ADN provenant d'eaux usées

L'eau provenant des égouts, contenant une très forte charge en matières fécales, il a été convenu que la méthode devait d'abord y être adaptée. De l'eau provenant de l'affluent de la station d'épuration de Fabreville a donc été filtrée et centrifugée avant que l'ADN n'en soit extrait. Afin de déterminer la quantité d'ADN requise pour les PCR, différentes quantités ont été testées avec des amorces pour l'amplification des gènes 16S ribosomiaux bactériens (Bruce et al., 1992) (Fig. 9). De cette manière, il a été possible de voir que la quantité d'ADN la plus élevée a été amplifiée sans que les inhibiteurs ne prennent le dessus était de 400 ng. Une fois ce fait établi, trois bandes ont pu être détectées grâce aux PCR et au multiplex PCR: celle de l'humain, celle du bœuf et celle du porc (Fig. 10).

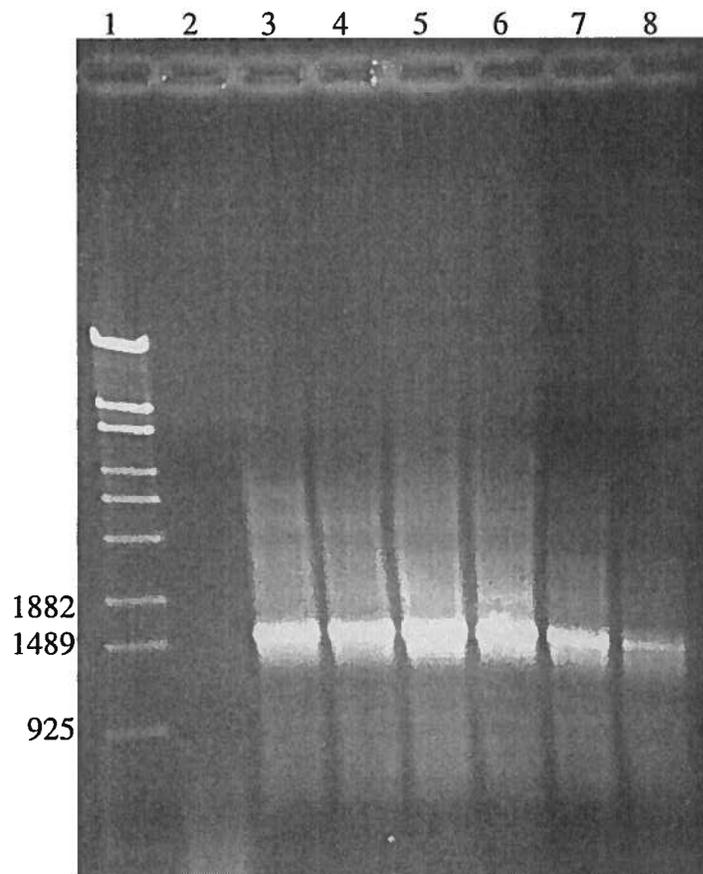


Figure 9 : PCR de l'ADN extrait d'eau usée avec les amorces du 16S bactériens. PCR avec 50 ng (3), 100 ng (4), 200 ng (5), 300 ng (6), 400 ng (7) et 500 ng (8) d'ADN. Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire λ Sty et Puits 2 : le contrôle négatif.

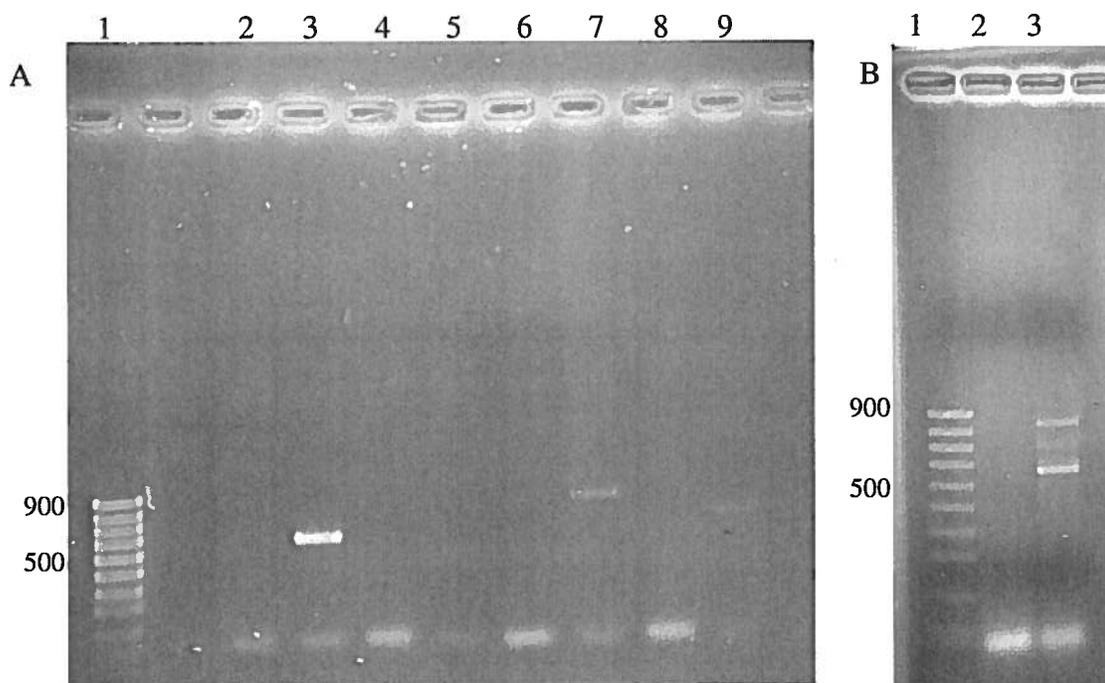


Figure 10 : PCR et multiplex PCR d'ADN extrait à partir d'eau usée. **A)** PCR avec les amorces Humito2 (3), Ovmito1 (5), Bomito1 (7) et Pomito3 (9). Puits 2, 4, 6 et 8 : les contrôles négatifs, **B)** Puits 2 : le contrôle négatif et Puits 3 : multiplex PCR. Les Puits 1 correspondent au marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 100 bp DNA ladder.

3.7.1) Résistance des marqueurs aux traitements

Comme certains pathogènes réussissent à survivre aux traitements des stations d'épuration, il fallait vérifier la capacité de l'ADN mitochondrial à persister à ces mêmes traitements. Pour ce faire, l'ADN a été extrait d'échantillons d'eau usée provenant de l'affluent, de l'effluent des traitements physico-chimiques et de l'effluent du traitement aux U.V. de la station d'épuration de Fabreville. Le multiplex PCR est parvenu à prouver que la séquence humaine résiste aux traitements physico-chimiques et même un peu aux ultra-violets (Fig. 11).

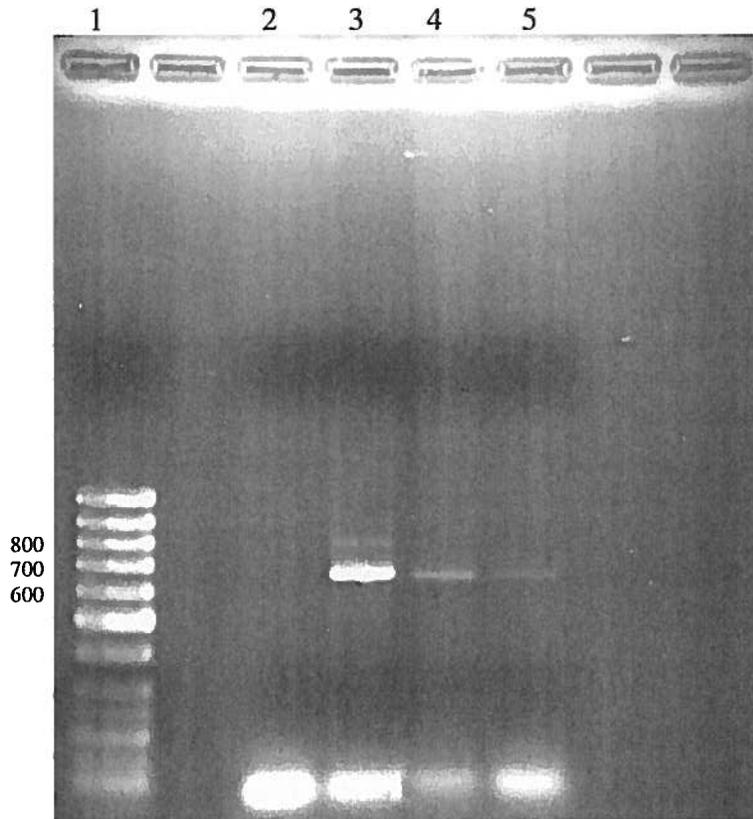


Figure 11 : Multiplex PCR d'ADN d'eau usée échantillonnée à divers endroits d'une station d'épuration. Multiplex PCR sur l'ADN extrait d'eau de l'affluent (3), de l'effluent des traitements physico-chimiques (4) et de l'effluent des U.V. (5). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 50 bp DNA ladder, Puits 2 : le contrôle négatif.

3.7.2) Temps de dégradation des marqueurs

Un autre paramètre jugé important pour cette étude est le temps de vie de l'ADN mitochondrial. Sa détermination s'est faite de la manière suivante : de l'eau usée provenant de l'affluent de la station d'épuration de Fabreville a été conservée à température pièce et des multiplex PCR des ADN extraits à partir de prélèvements d'un litre et demi exécutés après différents laps de temps ont été effectués. Il est visible sur la Figure 12 que les bandes présentes au jour 0 (celles du bœuf, du porc et de l'humain) ont été détectées au moins jusqu'au jour 5 de conservation.

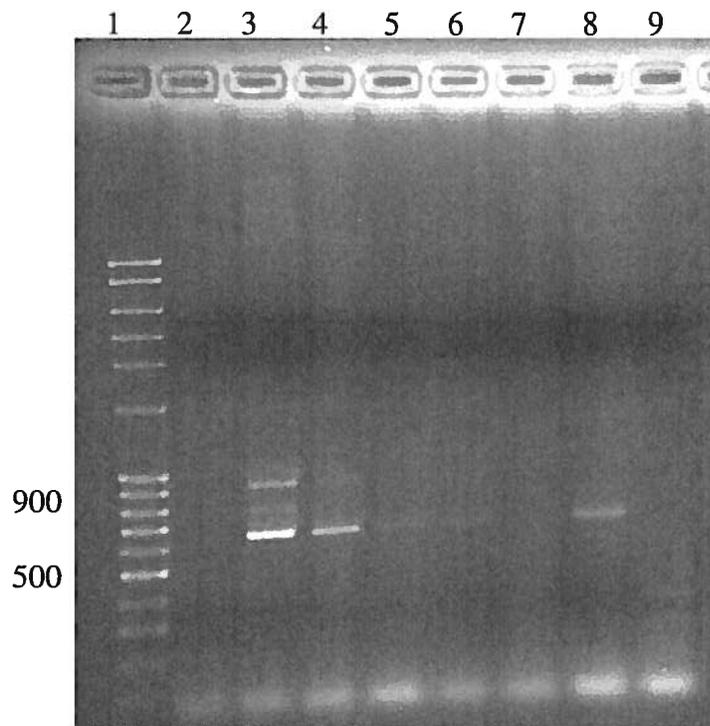


Figure 12 : Multiplex PCR d'ADN d'eau usée entreposée pendant 20 jours. Jour 0 (3) Jour 1 (4), Jour 2 (5), Jour 5 (6), Jour 9 (7), Jour 15 (8) et Jour 20 (9). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire Full-Ranger, Puits 2 : le contrôle négatif.

3.7.3) Nombre minimal de cellules détectables

La dernière expérience nécessitant de l'eau usée avait pour but d'évaluer le seuil de détection de la méthode c'est-à-dire le nombre minimal de cellules détectables. Cette fois, un échantillon d'eau usée provenant de l'effluent de la station d'épuration de Fabreville était requis. Afin d'éliminer complètement la présence des marqueurs à l'étude, cette eau a été stérilisée pendant 1 heure avant d'être transvidée dans 6 flacons de 1 litre. À chacun de ces 6 litres, des quantités croissantes de cellules humaines HRT-18 ont été ajoutées. L'ADN a été extrait et des multiplex PCR ont été faits, révélant l'existence d'un signal à partir de 10 cellules humaines par millilitre d'eau usée (Fig. 13).

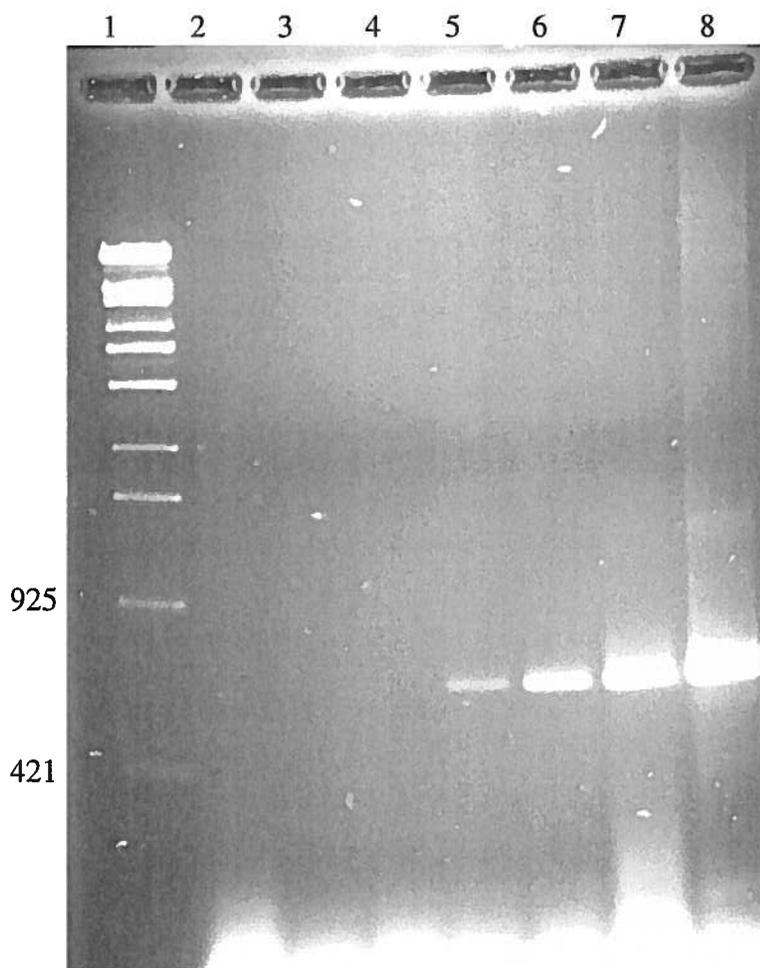


Figure 13 : Multiplex PCR d'ADN extrait de différentes concentrations de cellules humaines contenues dans 1 litre d'eau usée stérilisée. 0 cellule/ml (3), 1 cellule/ml (4), 10 cellules/ml (5), 100 cellules/ml (6), 1000 cellules/ml (7), 10000 cellules/ml (8). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire λ Sty, Puits 2 : le contrôle négatif.

3.8) Essais d'amplification de l'ADN provenant d'eaux de terres agricoles

Avant d'appliquer la méthode, une étape avec de l'eau de ruissellement était de mise, question de vérifier si elle parviendrait à identifier correctement la source de contamination fécale d'une eau contenant des matières fécales d'origine connue. Le premier échantillon analysé provenait de drains souterrains d'une ferme située à St-Lambert-de-Lauzon et a été prélevé le lendemain d'un épandage de fumier de vaches laitières dans les champs de maïs. Conformément aux attentes, seul l'ADN de bœuf a été détecté suite à l'amplification de l'ADN extrait de 350 ml de cette eau (Fig. 14). Le

deuxième échantillon avait été prélevé dans les fosses d'une ferme laitière de St-Placide. Dans ce cas, aucune donnée quant à l'épandage ou non de fumier n'a été communiquée. Le PCR tout comme le multiplex PCR et le PCR interne de l'ADN de cette eau n'a pas donné de signaux spécifiques d'amplification.

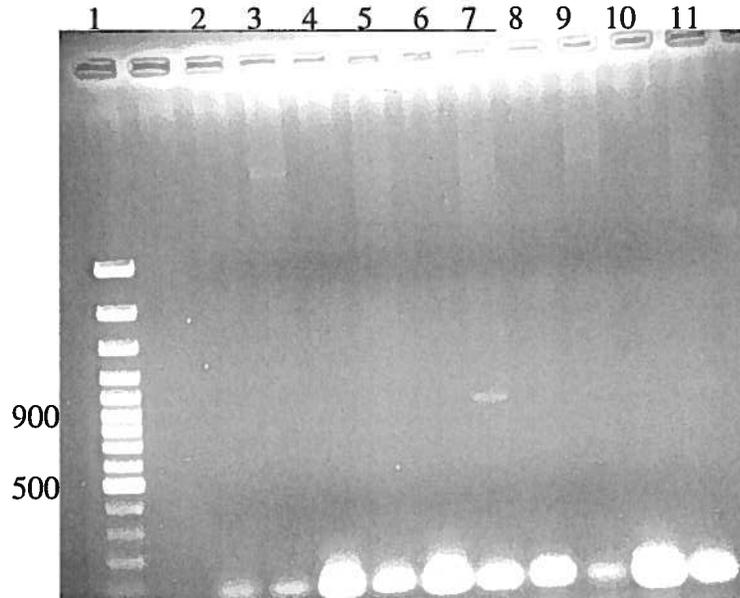


Figure 14 : PCR et multiplex PCR d'ADN extrait d'eau de la ferme de St-Lambert-de-Lauzon. PCR avec les amorces Humito2 (3), Ovmito1 (5), Bomito1 (7) et Pomito3 (9). Puits 11 : Multiplex PCR. Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Plus, Puits 2, 4, 6, 8 et 10 : les contrôles négatifs.

3.9) Application de la méthode

Une fois que tous les paramètres précédents ont été déterminés, la méthode a enfin pu être appliquée à de vrais échantillons comme du lisier de porc ou de l'eau de rivières.

3.9.1) Amplification de l'ADN provenant de lisier

Dans le but d'évaluer l'efficacité du traitement thermophile élaboré par l'équipe du Dr Pierre Juteau, l'ADN a été extrait à partir d'un échantillon de lisier de porc n'ayant subi aucun traitement et d'un échantillon de ce même lisier prélevé à la sortie du traitement. Ces ADN ont été amplifiés par PCR et multiplex PCR (Fig. 15). L'ADN de porc a été détecté dans le lisier non-traité grâce aux deux méthodes bien que la bande obtenue par

multiplex PCR soit d'une intensité beaucoup plus faible. Par contre, dans le cas du lisier traité, une quantité minime d'ADN de porc a été détectée et ce uniquement par PCR simple.

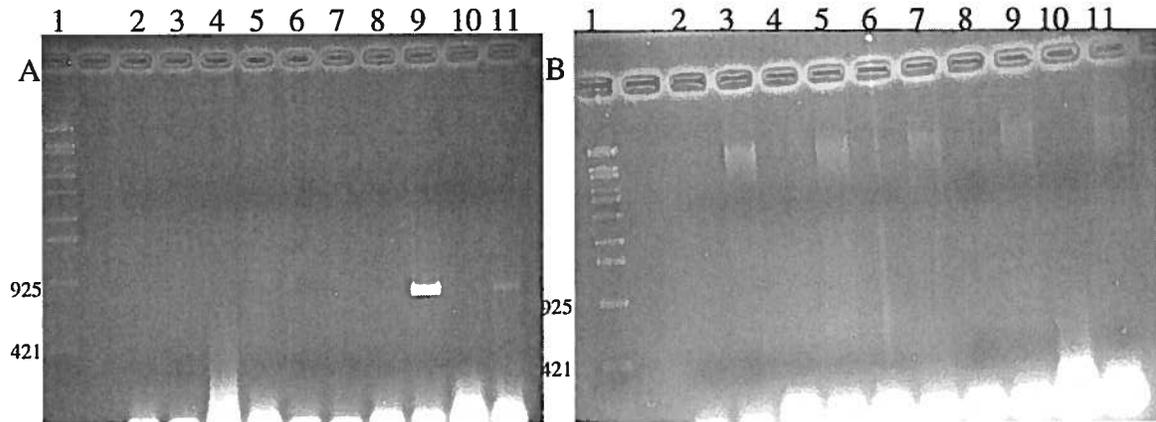


Figure 15 : Amplification d'ADN provenant de lisier brut (A) et de lisier traité (B). PCR avec les amorces Humito2 (3), Ovmito1 (5), Bomito1 (7) et Pomito3 (9). Puits 11 : Multiplex PCR. Puits 1 : les marqueurs de poids moléculaire λ Sty, Puits 2, 4, 6, 8 et 10 : les contrôles négatifs.

3.9.2) Amplification de l'ADN provenant d'eau de rivières

L'étape ultime de ce projet était de tenter d'identifier les sources de pollution fécale dans l'eau des rivières avec la méthode. Deux rivières ont donc été choisies pour cette analyse : la rivière l'Assomption et la rivière des Mille-Îles. L'ADN a été extrait des échantillons d'eau. Avant de procéder à son amplification, l'ADN de l'eau de la rivière l'Assomption a été purifié par un passage dans une colonne de PVPP. Malgré cela, rien n'a été détecté par PCR et PCR double (deuxième PCR avec les mêmes amorces). Un PCR interne a ensuite été tenté avec 1 μ l du produit du premier PCR et cet essai s'est soldé par l'obtention de résultats forts intéressants : la présence des 4 espèces dans l'eau (Fig. 16). Par contre, ni le PCR, ni le PCR double et ni le PCR interne n'ont été en mesure d'identifier la source de la contamination fécale dans l'eau de la rivière des Mille-Îles.

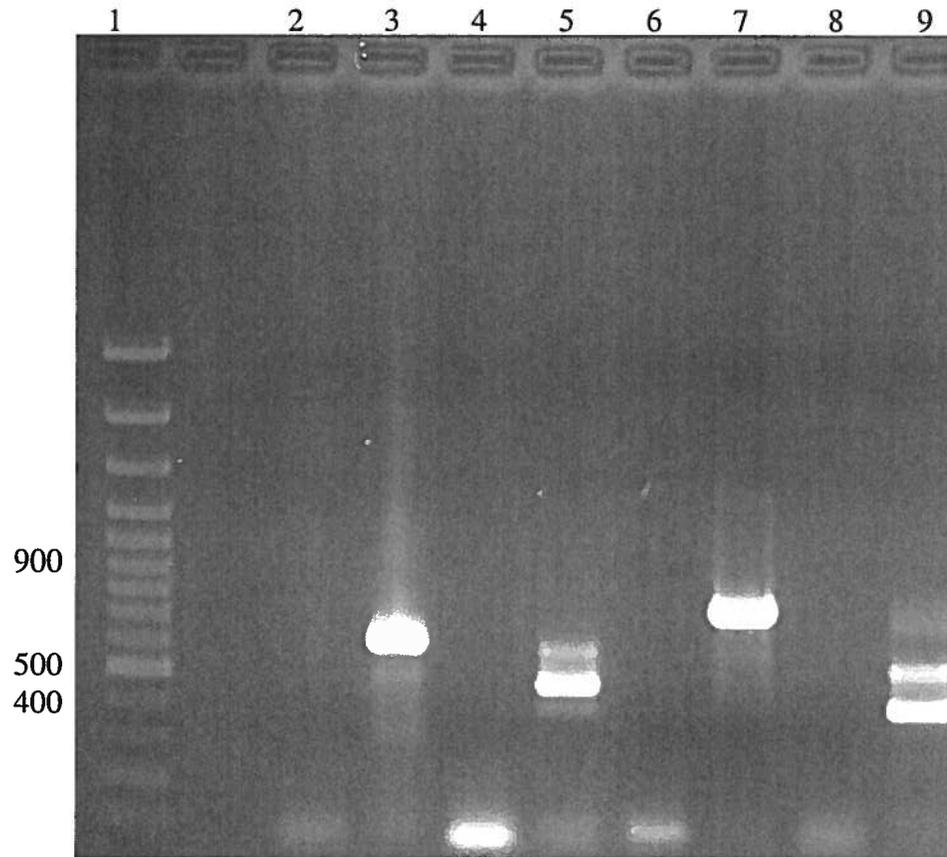


Figure 16 : PCR internes de l'ADN extrait de l'eau de la rivière l'Assomption. PCR interne avec les amorces Humito11 (3), Ovmito11 (5), Bomito11 (7) et Pomito11 (9). Puits 11 : Multiplex PCR. Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Plus, Puits 2, 4, 6 et 8 : les contrôles négatifs.

Chapitre 4 : Discussion

4.1) Explication du choix de la cible

La plupart des méthodes qui permettent d'identifier les sources de contamination fécale dans l'eau, ciblent les microorganismes ou leur ADN. Elles se basent sur le principe que certaines souches de bactéries ou que certains sérotypes de virus sont associés à un animal en particulier. Cependant, cibler ces microorganismes qui, dans la majorité des cas peuvent se retrouver dans les fèces de tous les animaux, rend difficile la différenciation entre diverses sources animales, limitant leur utilisation à la distinction humain-animaux (Khatib, Tsai et Olson, 2002). Par conséquent, tant qu'à tester une nouvelle méthode, autant abandonner ces cibles décevantes et en essayer une permettant de détecter directement l'espèce animale à l'origine de la contamination fécale dans l'eau. Il n'y a pas que des microorganismes dans les excréments, il y a aussi des résidus d'aliments non-digérés et des constituants cellulaires, principalement des cellules épithéliales différenciées qui se sont détachées des parois du tractus gastro-intestinal (Iyengar et al., 1991; Alexander et Raicht, 1998). Ces cellules peuvent être isolées des fèces et leur ARN peut même être détecté parmi l'ARN total extrait de fèces (Bandaletova et al., 2002; Alexander et Raicht, 1998). L'ADN étant plus facile à isoler que l'ARN, il était logique d'envisager la possibilité d'utiliser celui de ces cellules eucaryotes pour identifier directement la source de la pollution fécale.

L'ADN mitochondrial ainsi que l'ADN ribosomal ont été sélectionnés pour servir de cible au lieu de l'ADN génomique. Ce choix s'est fait en consultant les données suivantes.

L'ADN mitochondrial est présent en plusieurs copies par cellule ce qui constitue un avantage certain lorsque très peu de cellules sont présentes. De plus, il a évolué plus rapidement que l'ADN génomique, donc sa séquence est assez variable pour permettre la

conception d'amorces spécifiques d'espèce (Lahiff et al., 2001). Deux autres faits ont plaidé en faveur de l'ADN mitochondrial : l'existence de connaissances approfondies sur l'organisation des gènes et la disponibilité des séquences nucléotidiques de nombreuses espèces animales (Montiel-Sosa et al., 2000).

De 150 à 300 copies des gènes ribosomaux se retrouvent dans le génome humain et plusieurs centaines de copies sont présentes dans le génome des animaux ce qui avantage la détection (Omim entry 180450 dans NCBI; Naito et al., 1992). Puisque l'ADN ribosomal 18S des mammifères n'appartenant pas à l'ordre des primates ne diffère de celui des humains que par 1% (McCallum et Maden, 1985), l'ADN ribosomal 28S a été jugé plus adéquat pour cette étude. Bien que la plupart des régions de l'ADN ribosomal 28S soient conservées en longueur et en séquence nucléotidique, certaines parties ont évolué plus rapidement et présentent des variations d'une espèce à l'autre (Naito et al., 1992; Gorski, Gonzalez et Schmickel, 1987). Ces régions, dites variables, peuvent constituer une cible de choix pour détecter les différences génétiques entre espèces, puisque selon Kuo et al. (1996), leur longueur et leur séquence semblent spécifiques d'espèce. En effet, la longueur de ces régions, riches en G+C, varie considérablement parmi les vertébrés (Maden et al., 1987). Il est possible de le vérifier en comparant la longueur de la sous-unité 28S de l'ARNr de plusieurs espèces. Par exemple, elle mesure 4110 nucléotides chez *Xenopus laevis*, 4712 nucléotides chez la souris et 5035 nucléotides chez l'humain (Kuo et al., 1996).

Quant au choix des espèces animales que ciblait cette étude, il s'est fait en fonction des préoccupations québécoises. Il fallait non seulement inclure l'humain, qui est le plus grand pollueur des zones urbaines, mais aussi les animaux des principaux élevages du Québec : les moutons, les bœufs et les porcs.

4.2) Justification de l'abandon de l'ADNr 28S comme cible

Étrangement, comme dans l'étude faite par Naito et al. (1992), de nombreuses bandes peu intenses ont été obtenues suite à l'amplification de l'ADNr 28S de chaque espèce. Selon eux, cette particularité serait due à la présence des gènes d'ARNr sur plusieurs

chromosomes différents. En effet, l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 18S et 28S serait présent dans la région p12 sur chacun des satellites des chromosomes acrocentriques #13, 14, 15, 21 et 22 ainsi que dans deux sites mineurs de la région centromérique des chromosomes 1 et 2 (Pardo, Luciani et Stahl, 1975; Omim entry 180450 dans NCBI). Même si le profil des bandes était probablement spécifique d'espèce, cette stratégie a dû être abandonnée, n'étant pas pratique pour le multiplex PCR.

4.3) Choix des amorces

Puisque les amplifications prévues étaient de type multiplex PCR, il a été important d'élaborer des amorces ayant des températures d'appariement semblables pour éviter d'amplifier préférentiellement une cible. Pour ce faire, une attention particulière a dû être accordée à la longueur des amorces et à leur contenu en G+C qui idéalement devraient être situés entre 18 et 30 pb et entre 35 et 60%, respectivement (Elnifro et al., 2000). Cette étude a tenu compte de ces aspects comme le prouvent les données suivantes : toutes les amorces présentes dans le Tableau 2 présentaient une longueur de 21 à 27 pb et de 33 à 57% G+C. Toutefois, même en respectant les valeurs indiquées, des amplifications préférentielles pouvaient avoir lieu. C'est ce qui s'est produit avec les amorces Humito1, Pomito1 et Pomito2 : elles ont généré des signaux d'amplification beaucoup moins importants que les autres paires d'amorces. Deux processus peuvent expliquer le phénomène de l'amplification préférentielle : [1] le décalage du PCR, dû à des fluctuations dans les interactions réactifs-réactifs réduisant la concentration des gabarits d'ADN, à des variations dans les profils thermiques ou à des erreurs expérimentales; ou [2] la sélection du PCR (due aux différences dans le contenu en G+C qui mènent à des dénaturations préférentielles et à des appariements plus efficaces, à la présence de structures secondaires dans la cible qui affectent son accès et au nombre de copies du gène) (Elnifro et al., 2000). De plus, qui dit multiplex PCR dit plusieurs cibles de différentes longueurs afin de bien pouvoir les différencier sur gel. C'est pourquoi il a fallu s'assurer que chaque paire d'amorces ciblait une séquence différente d'au moins 50 pb. Aussi, les paires d'amorces choisies, Ovmito1, Humito2, Pomito3 et Bomito1, ont amplifié des séquences de 506 pb, 659 pb, 788 pb et 934 pb, respectivement. La même règle s'appliquait dans le cas des multiplex PCR internes dont les paires d'amorces,

Pomito11, Ovmito11, Humito11 et Bomito11, ont amplifié des fragments de 400 pb, 468 pb, 612 pb et 733 pb, respectivement. Dans ce dernier cas, il a fallu choisir les amorces à l'intérieur de la séquence amplifiée par les autres amorces. Finalement, comme pour toutes les amorces, il a fallu s'assurer qu'elles soient le plus spécifiques possible en plus de vérifier qu'elles ne puissent s'apparier à elles-mêmes et aux autres amorces présentes (Elnifro et al., 2000). En effet, la formation de dimères d'amorces peut produire de faux produits de PCR (Elnifro et al., 2000).

4.4) BSA dans le PCR

L'ajout de BSA dans le mélange réactionnel des amplifications PCR a été bénéfique à plusieurs points de vue ce qui en a justifié amplement le choix. Premièrement, il est reconnu que le BSA réduit l'inhibition de la Taq polymérase par les substances inhibitrices présentes dans les échantillons d'ADN, ce qui améliore inévitablement la sensibilité des réactions (Al-Soud et Radstrom, 2000). Deuxièmement, la spécificité des PCR peut être augmentée grâce à son emploi (Al-Soud et Radstrom, 2000). Il permet également l'amplification des séquences riches en G+C en diminuant leur température de dénaturation (Elnifro et al., 2000) et augmente la fidélité de la synthèse d'ADN (Al-Soud et Radstrom, 2000). De plus, il peut empêcher l'arrêt de la polymérisation qui peut survenir lors de la formation de structures secondaires dans les régions du gabarit d'ADN pendant l'extension (Elnifro et al., 2000). Un autre de ses avantages est qu'il peut agir comme osmoprotecteur en augmentant la résistance de la polymérase à la dénaturation (Elnifro et al., 2000).

4.5) Le multiplex PCR

Ce projet reposait sur la technique du multiplex PCR dont le principe est d'amplifier plus d'une séquence cible en utilisant plus d'une paire d'amorces (Elnifro et al., 2000). Son optimisation peut se révéler ardue puisqu'elle ne peut se faire que par essais et erreurs; la performance (spécificité, sensibilité et amplification préférentielle) de chaque paire d'amorces ne pouvant être prédite. Par contre, une fois que ses conditions sont établies, son usage permet d'économiser considérablement temps et efforts (Elnifro et al., 2000).

Donc, grâce au multiplex PCR, un plus grand nombre d'échantillons peut être traité en une seule fois.

De nombreux critères ont été évalués pour optimiser le multiplex PCR de notre méthode. C'est ainsi que les meilleures amorces (Humito2, Ovmito1, Bomito1 et Pomito3), la température optimale d'appariement (55°C), le nombre de cycles idéal (35) et la concentration de BSA requise (0.5 µg/µl) ont été déterminés. D'autres considérations ont guidé l'optimisation : la nécessité d'une étape de dénaturation initiale de 5 minutes pour aider à mieux dénaturer la cible et une étape d'élongation finale de 10 minutes pour finir l'élongation de la plupart des produits du PCR (Henegariu, 1997).

4.6) Explication des tests de sensibilité

Exécuter des tests de sensibilité a été nécessaire pour caractériser la méthode et pouvoir la comparer avec les autres approches existantes. Dans l'ensemble, les résultats obtenus sont relativement bons et démontrent une sensibilité assez élevée puisqu'ils correspondent à 3-150 génomes (3 pg par génome de 3×10^9 pb) dans le cas des PCR simples et multiplex et à moins d'un génome dans le cas des PCR internes. On aurait pu s'attendre à ce que le seuil de sensibilité du multiplex PCR soit plus élevé que celui des PCR simples vu qu'il est extrêmement difficile à optimiser, mais ça n'a pas été vraiment le cas, suggérant une assez bonne optimisation de notre part. De même, il a été surprenant que la présence d'ADN bactérien n'ait pas affecté beaucoup la sensibilité, car selon Machiels et al. (2000), un excès d'ADN bactérien inhibe les réactions de PCR. Quant aux PCR internes qui consistent à amplifier l'ADN grâce à deux réactions de PCR consécutives utilisant des paires d'amorces différentes (Elnifro et al., 2000), il était normal qu'ils aient une meilleure sensibilité que les PCR simples. En effet, ils sont reconnus pour améliorer la sensibilité puisque lors de leur réalisation, les substances inhibitrices de Taq polymérase sont diluées, donc par le fait même moins actives (Berthelet, Whyte et Greer, 1996). Finalement, le fait que les limites de détection ont varié d'une espèce à l'autre et même entre différents échantillons d'une même espèce, laisse suggérer que le nombre de mitochondries varie selon les espèces et les tissus.

La sensibilité de la méthode, elle, a été testée en concentrant la matière d'eau usée additionnée de cellules humaines, en extrayant l'ADN et en l'amplifiant par des réactions PCR. La limite de détection avec le multiplex PCR était de 10^3 à 10^4 cellules par litre. Avec le multiplex PCR interne, cette sensibilité aurait probablement été cent fois supérieure quoique ce protocole soit extrêmement difficile à réussir.

4.7) Amplification de l'ADN mitochondrial de fèces et d'eaux

Une grande quantité d'ADN total (400 ng) a été requise lors de l'amplification de l'ADN mitochondrial de fèces et d'eaux, ce qui est tout à fait normal si on considère les faits suivants. La fraction d'ADN animal dans un échantillon de fèces est très faible comparée à la fraction que représente les ADN microbiens et peut varier d'un échantillon à un autre. Par exemple, le pourcentage d'ADN humain dans les fèces humaines se situe habituellement entre 0.06% et 46% (Machiels et al., 2000). L'écart élevé entre ces 2 valeurs est dû à la microflore intestinale plus ou moins abondante qui se retrouve dans les fèces humaines. Celle-ci peut être composée de nombreuses bactéries telles que *Acidaminococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Megamonas*, *Megasphaera*, *Peptostreptococcus*, *Proteus*, *Ruminococcus* et *Veillonella* (Tannock, 2001). Le pourcentage de cellules animales cibles étant déjà faible, diminue encore une fois dilué dans un cours d'eau qui contient beaucoup plus d'organismes de toutes sortes (bactériens autant qu'eucaryotes).

4.8) Description de la station d'épuration de Fabreville

Il y a trois stations municipales d'épuration des eaux usées à Laval : celle d'Auteuil, celle de La Pinière et celle de Fabreville (Ministère de l'Environnement, 2002). La station d'épuration de Fabreville a accepté de collaborer à cette étude. Depuis 1986, elle dessert Fabreville et Laval-Ouest, en tout 59 000 personnes. Elle traite en moyenne $44\ 000\text{m}^3$ d'eau par jour et la rejette, traitée, dans la rivière des Mille-Îles. Son traitement consiste en une décantation physico-chimique suivie d'une désinfection à l'aide de lampes à rayons ultraviolets (voir l'Appendice C) et est très efficace : il enlève 99.9% des

coliformes fécaux (Service de la vie communautaire, de la culture et des communications, 2003).

4.9) Présence de cellules humaines, de bœuf et de porc dans l'eau usée

La présence d'ADN mitochondrial humain, bovin et porcin a été détectée dans l'affluent de la station d'épuration de Fabreville. Si la présence d'ADN humain était attendue, il n'en était pas de même pour le bœuf et le porc. En effet, la station de Fabreville reçoit l'eau usée de régions urbaines et agricoles, mais pas de fermes d'élevages. Puisqu'il a été établi que les ADN de bœuf et de porc ne peuvent être détectés dans les fèces d'un individu ayant consommé leur viande, leur présence ne peut être expliquée que de deux manières. Soit que les eaux de ruissellement de certains champs fertilisés avec du fumier de bœuf ou du lisier de porc se sont retrouvées dans les égouts municipaux via les drains, soit qu'il s'agissait de résidus de viandes jetés dans le broyeur à déchets dont sont équipés les éviers de cuisine de certaines maisons.

4.10) Détection de l'ADN pendant 5 jours

Il est tout à fait sensé que l'ADN mitochondrial ait une durée de vie assez longue : à cause de sa petite taille, de sa structure circulaire et de sa protection au sein de la mitochondrie, il est moins sensible aux dégradations que ne le serait l'ADN génomique et l'ADN ribosomal (perso.wanadoo.fr/ndesperance/adn/genmitosom.htm). Il est probable qu'au bout de 5 jours, les conditions environnementales et la présence de DNases ont eu raison de sa stabilité. Bien qu'il ne soit pas souhaitable de détecter trop longtemps les marqueurs dans l'eau, vu qu'il faut identifier l'origine de la pollution récente, un petit délai peut être pratique dans un contexte où les analyses ne peuvent être effectuées la journée même de l'échantillonnage.

4.11) Choix des rivières

Deux rivières polluées situées à moins de 100 km de la ville de Montréal ont été sélectionnées pour cette étude : la rivière L'Assomption et la rivière des Mille-Îles (voir l'Appendice D).

La première, la rivière L'Assomption, contient beaucoup de sédiments en suspension. Elle fait face à de graves problèmes engendrés par la pollution agricole diffuse provenant des méga-porcherie et par les effluents municipaux non-traités de la ville de Joliette (Saint-Laurent Vision 2000, 2002; Payment, Affoyon et Trudel, 1988). Donc, la qualité de l'eau de cette rivière et de ses tributaires se dégrade au fur et à mesure qu'elle descend vers son embouchure à Repentigny (Saint-Laurent Vision 2000, 2002). C'est à cet endroit qu'une étude faite par Payment et al. (1988) a déjà mesuré la présence de virus entériques humains, d'entérovirus animaux et de réovirus et conclu à leur présence en assez grande quantité. C'est également à cet endroit, où l'eau est considérée comme étant de très mauvaise qualité (Environnement Québec, 2003), qu'il a été décidé de prélever les échantillons nécessaires à cette étude.

La deuxième, la rivière des Mille-Îles, a été choisie parce qu'elle est différente de la rivière L'Assomption à plusieurs points de vue. Par exemple, bien qu'elle contienne aussi quelques sédiments en suspension, elle contient aussi beaucoup de particules organiques. De plus, sa qualité est principalement compromise par les rejets urbains. En temps de pluies, les ouvrages de débordement construits sur la circonférence de l'île de Laval se remplissent d'eau usée non-traitée provenant des réseaux d'égouts unitaires et finissent par la rejeter dans la rivière (Ministère de l'Environnement, 2002). Dans cette rivière, l'échantillonnage s'est fait à partir de l'île Bélair où la qualité de l'eau est satisfaisante (Ministère de l'Environnement, 2002).

4.12) Inhibiteurs et colonne PVPP

Certains composés qui inhibent les réactions de PCR peuvent être co-purifiés avec l'ADN lors de son extraction, rendant son amplification impossible (Reiss et Rutz, 1999). Dans cette étude, les inhibiteurs d'intérêt incluent ceux des fèces, ceux du sol et ceux des cours d'eau : notamment les sels biliaires, les bilirubines, les polysaccharides, l'héparine, les acides humiques et fulviques, les polluants chimiques et les cations (Trochimchuk et al., 2003; Berthelet, Whyte et Greer, 1996; Petit et al., 1999; Simpson, Santo Domingo et Reasoner, 2002). Ces inhibiteurs se lient à l'ADN et peuvent nuire à la dénaturation. De plus, ils peuvent interférer avec l'appariement des amorces ou empêcher la

reconnaissance de l'ADN par la Taq polymérase. Donc, avant de conclure à un résultat négatif de l'amplification PCR, il faut confirmer l'absence de substances inhibitrices (Reiss et Rutz, 1999). Plusieurs solutions sont proposées pour remédier à ce problème, entre autres l'ajout de BSA (Al-Soud et Radstrom, 2000) et la dilution de l'échantillon (Petit et al., 1999). Dans le cas de l'eau de la rivière L'Assomption, ces mesures étaient insuffisantes. Une méthode plus performante a alors été tentée : la colonne PVPP. Le principe général de cette colonne est d'éliminer les inhibiteurs grâce à une liaison sélective au PVPP (Trochimchuk et al., 2003).

4.13) Explication des résultats obtenus pour l'analyse des rivières

En plus de subir une purification par colonne PVPP, les échantillons d'eau provenant de la rivière L'Assomption ont dû être amplifiés par PCR interne. En plus d'augmenter la sensibilité, cette technique a pour avantage d'augmenter la spécificité : la deuxième réaction de PCR élimine les faux-positifs qu'aurait pu détecter la première (Berthelet, Whyte et Greer, 1996). Cela explique que, s'il n'y a pas eu de contamination croisée, il y avait bel et bien présence des ADN mitochondriaux des quatre espèces dans la rivière L'Assomption. Ce résultat correspond tout à fait aux données disponibles sur le bassin de la rivière L'Assomption qui comprend la ville de Joliette ainsi que la ville de Repentigny et qui, selon Environnement Québec (2003), comporte environ 73 000 unités animales dont 52% sont des porcs, 26% sont des bovins, 20% sont des volailles et 2% sont d'autres espèces (peut-être des moutons).

De son côté, l'analyse de la rivière des Mille-Îles n'a détecté aucune des espèces suggérant une absence de contamination fécale récente. Dans le cas des animaux, ce résultat n'est guère surprenant vu que très peu d'élevages se trouvent à proximité, mais en ce qui concerne l'humain, les attentes étaient tout autres. En effet, la rivière des Mille-Îles est bordée de zones urbaines dont celle de Laval au sud. Il aurait donc très bien pu y avoir présence de contamination humaine. Cependant, comme les précipitations dans la semaine précédant l'échantillonnage n'ont totalisé que 39 mm (pluie abondante: 50 mm ou plus en 24 heures ou moins)(Environnement Canada, 2004a; Mainville, 2004), les ouvrages de débordement de Laval n'ont pas dû rejeter d'eau usée non-traitée dans la

rivière. Donc, puisque l'eau provient d'un endroit où la qualité est considérée satisfaisante en temps normal, il est normal de n'avoir rien détecté.

4.14) Comparaison avec d'autres méthodes

Afin de déterminer si la méthode élaborée dans cette étude est meilleure que les nombreuses autres méthodes déjà testées, certaines de leurs caractéristiques ont été comparées ci-dessous.

4.14.1) Fiabilité des résultats

Pour qu'une méthode soit efficace, il est primordial qu'elle réussisse à identifier les bonnes sources de contamination et ce plusieurs fois pour un même échantillon à analyser. Les critères suivants sont ceux qui influencent la fiabilité des résultats.

4.14.1.1) Validité de la classification

Habituellement, la validité de la classification est mesurée par le taux moyen de classifications réussies (ARCC). Les ARCC ne sont pas disponibles pour toutes les méthodes et pour tous les niveaux de résolution. De plus, ceux qui sont disponibles diffèrent selon l'équipe qui les a engendrés. Il est donc difficile de procéder à des comparaisons. Par exemple, Parveen et al. (1999) ont évalué que, pour la différenciation entre humain et non-humain, le ARCC du ribotypage était de 82% et Carson et al. (2001) l'ont évalué à 97.1%. Il est donc impossible de dire si le profil d'utilisation des sources de carbone est meilleur ou non puisque selon Hagedorn (2003), le ARCC de cette méthode serait de 92.7%. Par contre, une vaste étude comparative rassemblant de nombreux chercheurs a été publiée en 2003. Chaque méthode avait à identifier parmi 5 sources possibles celle(s) qui contaminai(en)t les échantillons. Les méthodes, classées de celle ayant le ARCC le plus élevé à celle ayant le ARCC le plus bas, sont : le profil d'utilisation des sources de carbone avec 84.8-86.6%, l'analyse de la résistance aux antibiotiques avec 67-79%, le ribotypage avec 41-75%, l'électrophorèse sur gel en champ pulsé avec 71% et le rep-PCR avec 44-58% (Hagedorn et al., 2003; Myoda et al., 2003). Non seulement le rep-PCR n'est pas plus fiable qu'il faut, mais en plus sa reproductibilité est remise en question (Scott et al., 2002). La méthode que propose cette étude a quant à

elle un ARCC de 100% pour une classification entre 4 sources et advenant que des paires d'amorces soient élaborées pour identifier une cinquième source, son ARCC resterait probablement le même. Donc, sa validité est sans doute la meilleure et, jusqu'à maintenant, elle semble reproductible. Toutefois, une étude plus exhaustive est requise pour établir un ARCC plus réaliste.

4.14.1.2) Niveau de résolution

Aucune méthode ne permet d'identifier tous les animaux dont les matières fécales peuvent se retrouver dans l'eau. Cependant, certaines sont capables d'identifier une plus grande quantité d'espèces que d'autres. La détection de virus entériques humains se limite à l'identification de contamination humaine et ce, uniquement dans les cas où des individus sont malades. Quelques méthodes ne peuvent faire la distinction qu'entre humains et animaux comme le ratio coliformes fécaux/streptocoques fécaux (Field, Bernhard et Brodeur, 2003) et la détection de caféine (Ha et Stenstrom, 2000). Dans le cas du PCR ciblant *Bacteroides-Prevotella*, la pollution fécale détectée a pour origine soit les humains, soit les ruminants (Stewart et al., 2003). Quant aux méthodes dépendantes d'une banque de données, elles sont capables d'identifier autant d'espèces que ne le permettent leur banque, c'est-à-dire qu'une banque de données construite pour une bactérie se retrouvant chez plus d'espèces qu'une autre, permet nécessairement d'identifier une plus grande variété d'espèces. Les méthodes se basant sur l'amplification de marqueurs génétiques spécifiques d'espèces peuvent identifier autant d'espèces que ne le permettent les amorces disponibles. C'est le cas de l'approche préconisée ici. En effet, jusqu'à maintenant, quatre espèces ont été ciblées, mais avec la conception de nouvelles amorces, le nombre d'espèces animales pouvant être détectées, via leur ADN mitochondrial, augmenterait considérablement et pourrait même, avec le temps, dépasser celle des approches dites dépendantes des banques de données.

Il est toujours intéressant de pouvoir quantifier la pollution fécale provenant d'un animal en particulier. Cela permet de savoir à quoi il faut s'attaquer en premier pour remédier au problème. Il est donc normal que les méthodes qui sont quantitatives telles que l'analyse de résistance aux antibiotiques, le profil d'utilisation des sources de carbone,

l'électrophorèse sur gel en champ pulsé, le rep-PCR et l'analyse tRFLP soient préférées à celles qui ne le sont pas (les PCR spécifiques d'hôte, la détection de gènes de toxines, le typage de phages F+, la détection d'entérovirus et d'adénovirus ainsi que l'approche de cette étude) (Griffith, Weisberg et McGee, 2003).

4.14.1.3) Sensibilité

En ce qui concerne la sensibilité des approches, les données contenues dans la littérature sont fragmentaires et ont souvent été calculées de façons différentes. De plus, il est difficile de comparer notre méthode avec les autres puisque celle-ci ne cible pas une espèce bactérienne et ses limites de sensibilité ne peuvent donc pas être exprimées en unité formatrice de colonie (cfu). Par exemple, pour la technique qui cible *Bifidobacterium dentium*, les limites de détection du PCR suivi de l'hybridation avec la sonde BDE ou BAN ont été estimées à 10^3 cfu/ml et 10^4 cfu/ml, respectivement. En présence de suspensions mixtes bactériennes, la sonde BDE donne encore de meilleurs résultats. En effet, cette sonde détecte une cellule cible par 10 000 cellules non-ciblées tandis que la sonde BAN n'est capable de détecter qu'une cellule cible par 100 cellules non-ciblées (Nebra, Bonjoch et Blanch, 2003). Khatib et al. (2002) ont déterminé que la technique moléculaire faisant appel aux gènes de la toxine LTIIa de *E. coli* est capable de détecter 7×10^3 à 10^4 cfu par 250 ml (0.41-0.041 fg d'ADN). Notre méthode peut sembler moins sensible puisque par PCR interne les limites de sensibilité sont de 1 à 0.1 pg d'ADN, mais il ne faut pas oublier que les méthodes ci-dessus calculent leur valeur après avoir fait la culture des bactéries qu'elles ciblent.

4.14.1.4) Durée de détection

Afin de pouvoir évaluer si la contamination fécale détectée dans l'eau est récente ou non, de déterminer l'écart requis entre deux analyses et dans certains cas de s'assurer de la validité des résultats obtenus, il est capital de connaître la durée de vie de la cible d'une approche. Cependant peu de chercheurs ont pris la peine de déterminer cette durée. Il est notoire que l'ADN a une durée de vie plus longue que les bactéries puisqu'à leur mort il est relargué et peut toujours être détecté. Celui de *Bifidobacterium* peut résister de quelques jours jusqu'à deux semaines dépendant des conditions (Bernhard et Field,

2000). Celui de *Bacteroides* est amplifiable pendant 14 jours à 4°C alors qu'à 14°C il n'est détectable que pendant 4 ou 5 jours (Field, Bernhard et Brodeur, 2003). L'ADN mitochondrial des animaux ciblés par la méthode qui a été mise au point dans cette étude résiste environ 5 jours à température pièce. Cela signifie que sa présence est autant annonciatrice de contamination récente que la présence des ADN ciblés par les autres méthodes. Leur détection n'indique pas nécessairement une contamination très récente, mais il est moins probable de rater un événement de contamination qu'avec une cible qui ne dure que quelques heures comme les bifidobactéries qui ne peuvent être cultivés après 5 heures dans l'eau douce ou après 10 heures dans l'eau salée (Bernhard et Field, 2000). En outre, les résultats obtenus avec notre méthode sont probablement beaucoup plus valides que ceux des approches basées sur la détection de plusieurs microorganismes comme c'est le cas du ratio coliformes fécaux/streptocoques fécaux ou du typage des coliphages F+. En effet, ces dernières doivent prendre en considération qu'il est possible que les différentes espèces qu'elles ciblent n'ont pas nécessairement la même durée de vie et que leurs résultats peuvent être biaisés advenant une contamination plus ou moins récente.

4.14.2) Coût et logistique

La méthode ayant la meilleure efficacité n'est pas toujours adoptée. Dans certains cas, elle peut être abandonnée au profit d'une autre un peu moins efficace, mais moins chère, plus rapide et d'un degré de difficulté moindre. Cela explique l'importance de comparer les critères suivants.

4.14.2.1) Banque de données

Les méthodes visant à identifier les sources de contamination fécale dans l'eau peuvent être classées en deux grandes catégories : celles qui sont dépendantes d'une banque de données et celles qui ne le sont pas. Les méthodes nécessitant une banque de données distinguent les sources de pollution fécale en identifiant les profils génétiques de bactéries et en les comparant avec ceux de sources connues contenus dans les banques de données (Griffith, Weisberg et McGee, 2003). Elles comprennent le ribotypage, le t-RFLP, le rep-PCR, les profils de résistance multiple aux antibiotiques, les profils d'utilisation des

sources de carbone (Bernstein, Griffith et Weisberg, 2002), le typage de phages (Simpson, Santo Domingo et Reasoner, 2002), le sérogroupage des microorganismes selon les antigènes somatiques O (Scott et al., 2002), l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (Myoda et al., 2003), l'analyse de la résistance aux antibiotiques et la méthode Kirby-Bauer (Harwood et al., 2003). Aucune étude n'a encore évalué la grandeur minimum ou optimale pour une banque de données, mais il est évident que ces valeurs seront spécifiques à la méthode utilisée et au cours d'eau analysé (Bernstein, Griffith et Weisberg, 2002). Quant aux méthodes ne requérant pas de banque de données, elles se basent sur les profils de croissance des bactéries dans le cas de celles dites phénotypiques ou sur l'identification de marqueurs génétiques uniques aux bactéries fécales de l'espèce hôte dans le cas de celles dites génotypiques (Griffith, Weisberg et McGee, 2003). Il s'agit de l'amplification de *Bacteroides*, de celle des entérotoxines, de la détection grâce aux anticorps IgA et de celle des coliphages F+ (Bernstein, Griffith et Weisberg, 2002). La méthode ciblant l'ADN mitochondrial proposée dans cette étude fait également partie des approches indépendantes de la construction d'une banque de données.

4.14.2.2) Temps

La rapidité d'exécution est un critère essentiel à considérer lorsqu'il faut implanter une technique dans les analyses de routine. Plus les résultats sont obtenus rapidement, mieux c'est, car cela signifie que les mesures pour protéger la santé publique peuvent être prises plus rapidement. Les approches chimiques prennent du temps à réaliser (Salter, 2002). Les méthodes génotypiques sont beaucoup plus rapides que les méthodes phénotypiques qui peuvent prendre plusieurs jours avant de donner des résultats (Simpson, Santo Domingo et Reasoner, 2002). Les méthodes faisant appel à une banque de données sont, quant à elles, plus lentes que celles qui s'en passent du fait que la banque de données doit être construite et que les résultats doivent passer par une étape de comparaison avec ceux contenus dans la banque de données (Stewart et al., 2003). D'ailleurs, une analyse faite par ribotypage prend deux semaines (Field, Bernhard et Brodeur, 2003). Donc, logiquement, les approches par lesquelles les résultats sont produits le plus rapidement sont les méthodes moléculaires n'ayant pas besoin de banques de données, comme la nôtre dont l'exécution dure environ 12 heures.

4.14.2.3) Coût

En général, les méthodes basées sur le génotype des microorganismes sont plus onéreuses que celles basées sur le phénotype (Harwood et al., 2003). Certaines méthodes phénotypiques sont plus chères que les autres : par exemple, celles ciblant des bactéries anaérobies, comme *Bacteroides* et *Bifidobacterium*. En effet, des équipements spéciaux, habituellement non-disponibles dans un laboratoire ordinaire, sont requis pour leur culture (Simpson, Santo Domingo et Reasoner, 2002). Il est également reconnu que les approches ne nécessitant pas de banques de données sont moins coûteuses que celles qui en sont dépendantes : la construction de banques de données n'étant pas sans coût (Stewart et al., 2003). Cependant le prix n'est pas le même pour toutes les banques de données: celles des phénotypiques étant un peu moins chères à bâtir que celles de leurs homologues génotypiques (Harwood et al., 2003). De plus, les méthodes dont la cible varie le moins pour une source sont meilleur marché que les autres vu que leurs banques de données n'ont pas à être mises à jour aussi souvent (Bernstein, Griffith et Weisberg, 2002). Les approches chimiques sont, quant à elles, réalisées avec des équipements très onéreux (Salter, 2002). C'est le cas de la chromatographie gazeuse avec laquelle le ratio des concentrations de coprostanol/cholestanol est déterminé (Ha et Stenstrom, 2000). Notre méthode est donc moins abordable que ne le serait une méthode non-moléculaire telle que le ratio coliformes fécaux/streptocoques fécaux (Ha et Stenstrom, 2000), mais elle est beaucoup plus abordable qu'une méthode comme le ribotypage qui nécessite l'achat de robots pour son automatisation (Myoda et al., 2003) en plus de la construction d'une banque de données (Scott et al., 2002).

4.15) Limites et qualités de la méthode

L'approche ciblant l'ADN mitochondrial eucaryote, comme toutes les autres méthodes, possède des forces et des faiblesses.

Parmi les quelques inconvénients reliés à cette méthode, on retrouve en tête de liste le fait que la détection d'un signal n'est pas nécessairement significative d'une contamination fécale. En effet, l'ADN mitochondrial pourrait aussi provenir de cellules qui se seraient détachées de la peau de nageurs, de cadavres ou de carcasses animales. Afin de remédier

à ce problème, une technique de détection de la présence de contamination fécale devrait être utilisée au préalable. Un autre inconvénient, qui est plutôt un désagrément, est l'utilisation de PCR internes qui compliquent l'application pratique des PCR en plus de rendre les multiplex PCR peu concluants et d'augmenter les chances de contaminations croisées (Elnifro et al., 2000).

La méthode a beaucoup plus de qualités que de limites. Elle est simple, efficace, fiable, reproductible, relativement rapide, assez sensible, et permet de traiter un grand nombre d'échantillons à la fois. Il s'agit donc d'une méthode avec laquelle il faudra sûrement compter dans l'avenir.

4.16) Perspectives

Cette étude suggère de nombreuses nouvelles avenues de recherche. Premièrement, il reste à parfaire l'optimisation de la méthode afin d'améliorer l'efficacité de l'extraction d'ADN, d'augmenter la sensibilité et la rapidité, de permettre la quantification, l'application en eau salée et la détection de plus d'espèces. Par exemple, une méthode d'extraction ayant un meilleur taux de récupération d'ADN telle que celle proposée par Petit et al. (1999) qui améliore de 65% l'extraction pourrait être utile. Afin d'augmenter la sensibilité, la purification de l'ADN pourrait être tentée en présence de farine de patate qui, selon Deuter et al. (1995), a la propriété de lier les acides biliaries des fèces et donc d'ôter une partie des inhibiteurs. Un autre moyen d'augmenter la sensibilité serait peut-être d'extraire uniquement l'ADN mitochondrial. De cette manière, l'ADN bactérien ne pourrait plus interférer avec l'ADN cible. Au moins trois méthodes sont disponibles dans la littérature : celle basée sur une dénaturation alcaline sélective (Palva et Palva, 1985), celle faisant appel à un gradient de CsCl (Welter, Meese et Blin, 1988) et celle qui lyse les mitochondries une fois que l'ADN nucléaire est digéré (Zimmerman et al., 1988). La rapidité pourrait facilement être augmentée en adaptant la méthode à un appareil de PCR plus récent dans lequel le passage d'une température à une autre se fait beaucoup plus rapidement. De plus, des expériences avec la technique de PCR en temps réel devraient être exécutées pour mettre au point une quantification des résultats. Même si l'eau salée n'est pas supposée avoir d'effet sur les méthodes d'identification de la source de la

contamination fécale (Griffith, Weisberg et McGee, 2003), des tests devront être faits pour s'en assurer. Des amorces ciblant d'autres espèces susceptibles de contaminer les cours d'eau pourraient être élaborées afin de rendre la classification des sources plus précise et de l'adapter à d'autres pays. Les prochaines amorces pourraient cibler les animaux domestiques (chats et chiens), les animaux sauvages (castors, mouettes, etc.), les animaux des autres élevages présents au Québec (autruches, bisons, poulets) et les animaux spécifiques aux pays intéressés par l'application de la méthode.

Deuxièmement, il reste à conduire de vastes études comparatives valables englobant toutes les méthodes. Tout comme celle qui a récemment été publiée dans le *Journal of Water and Health* (Field et al., 2003; Griffith, Weisberg et McGee, 2003; Harwood et al., 2003; Myoda et al., 2003; Noble et al., 2003; Ritter et al., 2003; Sterwart et al., 2003), elles devront s'attarder sur plusieurs critères pouvant être regroupés dans 3 catégories. La première catégorie comprend la reproductibilité, la précision de la classification, la fiabilité, le niveau de résolution, la stabilité de la matrice, la stabilité géographique et la stabilité temporelle. Dans la deuxième catégorie, des critères tels que les liens avec la source, la santé publique et les indicateurs de contamination fécale ainsi que la facilité de communication au public et aux instances administratives sont à déterminer. Quant à la troisième catégorie, elle englobe les critères suivant : les équipements requis, l'entraînement nécessaire, la grandeur de la banque de données, la durée d'implantation, le coût par échantillon, le coût nécessaire pour s'assurer que les résultats sont défendables légalement et le temps de traitement d'un échantillon.

Troisièmement, il serait sans doute possible d'adapter la méthode à des applications dans d'autres domaines. Par exemple, il serait facile d'utiliser cette méthode en médecine légale pour identifier la provenance de sang, de sperme, d'os, et de tissus prélevés lors d'enquêtes policières. L'industrie alimentaire pourrait également bénéficier de cette méthode que ce soit pour vérifier l'absence de protéines animales dans la nourriture destinée aux élevages bovins et ainsi prévenir l'apparition de la maladie de la vache folle ou pour vérifier si l'étiquetage d'un produit en vente est conforme à sa composition réelle.

Conclusion

Malgré tous les efforts faits pour l'enrayer, la pollution fécale dans les cours d'eau constitue toujours un problème majeur. En identifier la source permet de mettre en place les mesures correctrices appropriées. L'objectif de cette étude était donc de développer une nouvelle méthode moléculaire permettant de relier la contamination fécale de l'eau à sa source, puisque, jusqu'ici, aucune des approches proposées pour le faire n'est complètement satisfaisante aux yeux de la science. Il fallait donc innover en concevant des amorces spécifiques d'espèces dont la cible n'avait encore jamais été envisagée. Ensuite, comme dans toute mise au point, divers paramètres ont dû être vérifiés : la spécificité de ces amorces, la méthode d'extraction d'ADN nécessaire pour chaque échantillon, la sensibilité des PCR et la capacité de détection des marqueurs dans des échantillons environnementaux.

Une méthode a bel et bien été développée durant cette étude. Il s'agit de PCR, multiplex ou internes selon le cas, qui ciblent l'ADN mitochondrial des animaux, plus particulièrement de l'humain, du mouton, du bœuf et du porc. Les diverses expériences menées au cours de ce projet ont permis de démontrer que ces PCR devaient être réalisées dans les conditions suivantes: 35 cycles avec une température d'hybridation de 55°C en présence de 0,5 µg/µl de BSA. Elles ont également permis d'évaluer que cette méthode est sensible puisque, par PCR interne, les limites de sensibilité mesurées se situaient entre 1 et 0,1 pg d'ADN des génomes animaux et que 10 cellules humaines peuvent être détectées dans 1 ml d'eau usée par multiplex PCR. De plus, l'ADN mitochondrial a été détecté avec succès dans les échantillons de tissus, de fèces, d'eau usée, d'eau de ruissellement de fermes, de lisier de porc et d'eau de rivières.

Ces résultats sont encourageants, ils sont la preuve qu'une méthode innovatrice, fiable, rapide et simple est maintenant disponible. Dans l'avenir, la qualité de tous les cours d'eau de la province pourra être améliorée grâce aux indications qu'elle fournira à leur sujet.

Appendice A

Alignements des séquences ayant conduit au choix des amorces

Les séquences de l'ADN mitochondrial de l'humain (# J01415 dans GenBank), porcine (#AF034253), ovine, (#AF010406), bovine (# J01394) et de poulet (#AY235570) ont été alignées avec le programme CLUSTALW. Seules les régions choisies pour la conception des amorces sont illustrées

Alignement des séquences mitochondriales ayant conduit aux amorces finales d'humain

	<u>Humito2-G</u>	<u>Humito1-G</u>	
Humain	12937	AGCCCTTC	TAAACGGTAA
Boeuf	12348	CTTCATACTAA	CCCCAAGCGACT
Poulet	12450	CACCCACCCAA	CCCCAAA
Porc	12362	CTTTATACTAA	CAATGAATGCCAAACAT
Mouton	12362	CTTTATACTAA	TCCAAACGACTCAAAACCT

Humain	13018	GTCTCCACCCCT	GACTCCCCTCAGGCAT
Boeuf	12429	GCCTCCACCCGT	GACTTCCCTTGCAAT
Poulet	12528	GCCTTCACCCAT	GACTTCCAGCAGCAAT
Porc	12443	GACTACATCCC	TGATTGCCCTCAGCAAT
Mouton	12443	GCCTACATCCAT	GACTACCCTCTGCAAT

Humain	13099	GCAGGAATCT	TCTTACTCATCCGCT
Boeuf	12510	GCAGGTATCT	TCCCTACTAATCCGTT
Poulet	12609	GCTGGAATTT	TTTACTCATCCGACCC
Porc	12524	GCAGGGTAT	TTCTACTCATCCGCT
Mouton	12524	GCAGGCATCT	TCTTACTTAATCCGGT

Humain	13180	CGCTATCACCA	CTGTTCGCAGCAGT
Boeuf	12591	AGCCATTACCA	CACTATTACAGCAAT
Poulet	12690	TGCTCTATCAA	CACTCTTTGCCGCAACAT
Porc	12605	AGCTATCACCA	CCCTTATTACAGCACT
Mouton	12605	GGCTATAACCA	CACTATTATTCACAGCAAT

Humain	13261	GTCAAC	TAGGACTCATAA
Boeuf	12672	GTCAACTGGGC	CTATAA
Poulet	12771	GCCAACTAGGC	CTCA
Porc	12686	GCCAACTAGGC	TTGATA
Mouton	12686	GCCAACTGGGC	CTCATA

Alignement des séquences mitochondriales ayant conduit aux amorces de bœuf

	<i>Bomitoi-G</i>	<i>Bomitol1-G</i>	
Humain	12389	TCACCCCACTACTAGGCCCTCTCCCTAGCAGCAGCGGCAAAATCAGCCCAATTAGGCTCTCCACCCCTGACTCCCTCAGCC	12469
Bœuf	12737	ACATACCCCTTGATTGGACTAGCAATAGCTGCAACCGGAAAATCCGCCCAATTTGGCCCTCCACCCGGTACTCCCTCTGCA	12817
Pculet	12473	CCCTCCCTCCCTGGCCCTAAATCCCTAGCCGCCACACGNAATCCGGCTCAATTTGGCCCTCACCCATGACTCCAGCAGCA	12553
Perc	12388	ACATACCAATTAATCGGCCCTACTCTTAGCTGCAGCAGGAAAATCAGCTCAATTCGGACTACATCCCTGATTTGCCCTCAGCA	12468
Mcuton	12388	ACCTACCCCTAAATAGGACTAAATCTTAGCTGCAACCCGAAAATCCGCACAATTTGGCCCTACATCCATGACTACCCCTCTGCA	12468
		*****	*****
Humain	12470	ATAGAAGGCCCCACCCAGTCTCAGGCCCTACTCCACTCAAGCACTATAATGTTGTATGAGGAAATCTTTTACTCATCCGCTT	12550
Bœuf	12818	ATAGAAGGCCCAACTCCCGTCTCAGCACTACTCCATTCGAAGCACAATAGTGGTAGCAGGATCTCTCCCTACTPATCCGTTT	12898
Pculet	12554	ATAGAAGGCCCAACCCCTGTCTCCGGCTACTCCATTCAGCACAATAGTAGTGGTGGAAATTTTTTACTCATCCGGCAC	12634
Perc	12469	ATAGAAGGCCCAACTCCCGTATCAGCATTTACTACACTCCAGTACAATAGTAGTAGGCGGTAATTTCTACTCATCCGCTT	12549
Mcuton	12469	ATAGAAGGCCCAACCCCGTCTCAGCACTACTCCACTCAAGCACAATAGTAGTAGGCGGATCTCTCCCTACTPATCCGCTT	12549
		*****	*****
Humain	12551	CCACCCCTTAGCAGAAAAATAGCCCACTAAATCCAAAATCTAACACTATCTTAGGGGCTATCACCCACTCTGTTCGGCAGCAG	12631
Bœuf	12899	CTATCCCTCACAGAAAAACAATAATACATCCAACTATTAATATCTTAGGAGCCATFACCACACTATTTACAGCAA	12979
Pculet	12635	CCACCCCTTCCIGTCATCCAAATAAACAGCCCTGACAACTGCTGCTATGCTTGGTGGTCTATCAACACTCTTTGCCGCAA	12715
Perc	12550	CTACCCCTTAAIAGAAAATCAACAACCTAGTTCAAACTATAACACTATGCCCTAGGAGCTATCACCACTTATTTACAGCAC	12630
Mcuton	12550	TTATCCACTAACAGAAAAACAATAATTTGGCCCAATCAATCATATTTCTTAGGGGCTATAACCACTATTTACAGCAA	12630
		*****	*****
Humain	12632	TCTGGCCCTTACACAAAAATGACATCAAAAAAATCCTAGCCCTTCCACTTCAAGTCAACTAGGACTCAATAATAGTTACA	12712
Bœuf	12980	TATGGCCCTCACCCAAAATGACATTAATAAATAATCATCGCCCTTCCACATCCAGTCAACTGGGCCCTATAATAGTAACT	13060
Pculet	12716	CATGGCTCTCACTCAAAACGACATCAAAAAAATCATGGCTTCCACTTCAAGCCCACTAGGCCCTCAATAATAGTCACA	12796
Perc	12631	TATGTGCAATCACAAAAATGATATCAAAAAAATCGTAGCCCTTCTCAACTTCAAGCCCACTAGGCTTGATAATAGTGACA	12711
Mcuton	12631	TATGGCCCTCACCCAAAATGATATCAAAAAAATTAATCGCTTCTCTACATCCAGCCCACTCGGCCCTCAATAATAGTAAACA	12711
		*****	*****
Humain	12713	ATCGGCATCAACCAACCACCCCTAGCATTTCCCTGGACATCTGTACCACGCCCTCTTCAAAAGCCATACTATTTATGTGCTC	12793
Bœuf	13061	ATTGGCATTAACCAACCCTTACCTAGCTTTCCCTCCACATCTGTACCACGCCCTTTTCAAAAGCTATACTATTCATATGCTC	13141
Pculet	12797	ATTGGCTAGACCTCCCCCACTAGCCCTTCCCTCCACATCTCAACCCCAAGCCCTCTTTAAAGCTATATTTCTTATGCTC	12877
Perc	12712	ATCGGCATCAACCAACCACCCCTAGCATTTCTTCCACATCTGCATGACCCCTTCTTCAAAAGCAATACTATTCATATGCTC	12792
Mcuton	12712	ATCGGAATTAATCAACCCCACTAGCATTTCCCTCCACATCTGCATGACCCCAAGCCCTTCTTCAAAAGCCATAATTTATATGCTC	12792
		*****	*****

Appendice B

Photos de tests de sensibilité

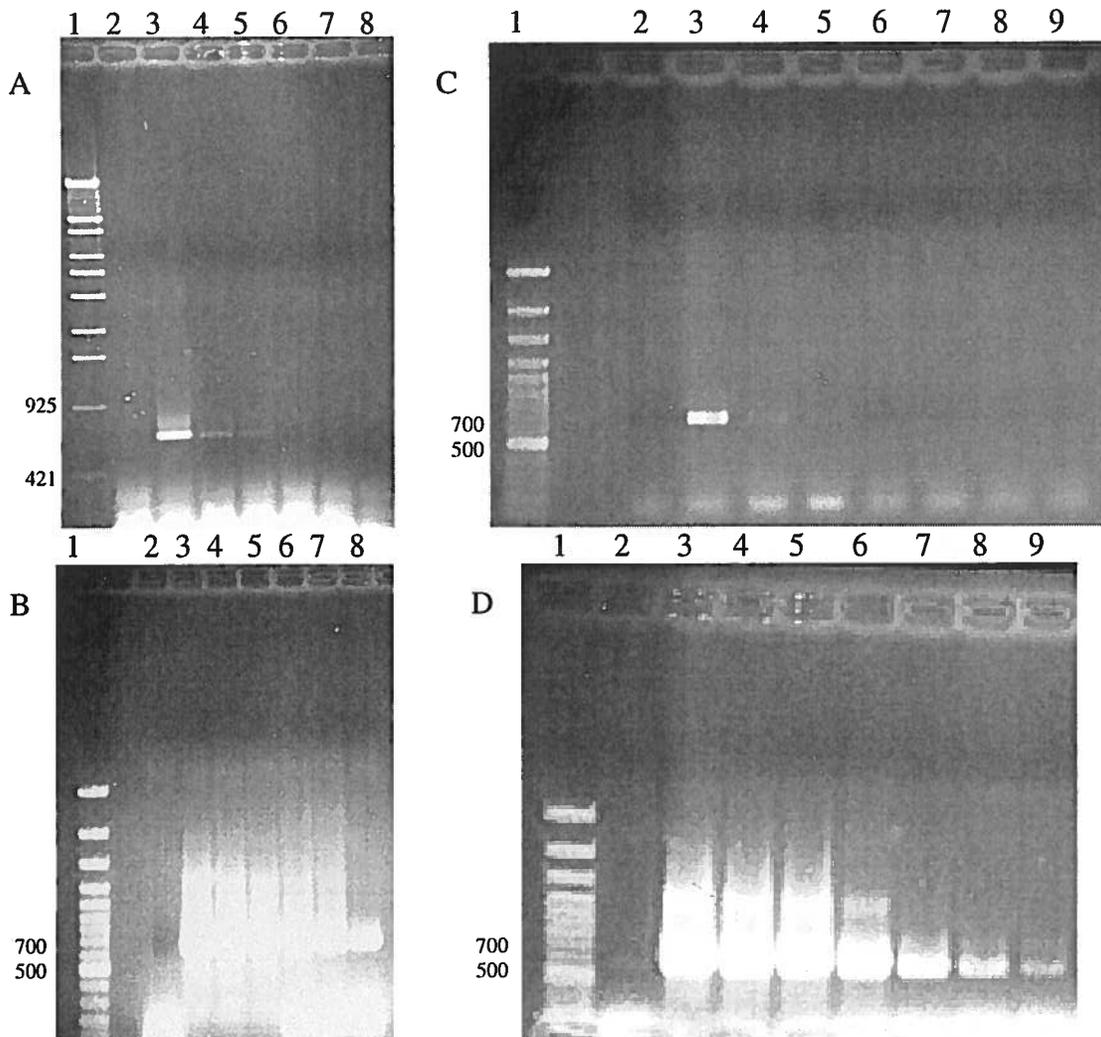


Figure 17 : Tests de sensibilité avec les ADN humains seuls pour les PCR simples (A) et les PCR internes (B). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire, Puits 2 : le contrôle négatif λ Sty ou GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Plus, Puits 3-8 : 10000, 1000, 500, 10, 1, 0.1 pg d'ADN, respectivement. Tests de sensibilité avec les ADN humains mélangés avec 100 ng d'ADN bactérien pour les PCR simples (C) et les PCR internes (D). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Plus, Puits 2 : le contrôle négatif, Puits 3-9 : 10000, 1000, 500, 100, 10, 1, 0.1 pg d'ADN, respectivement.

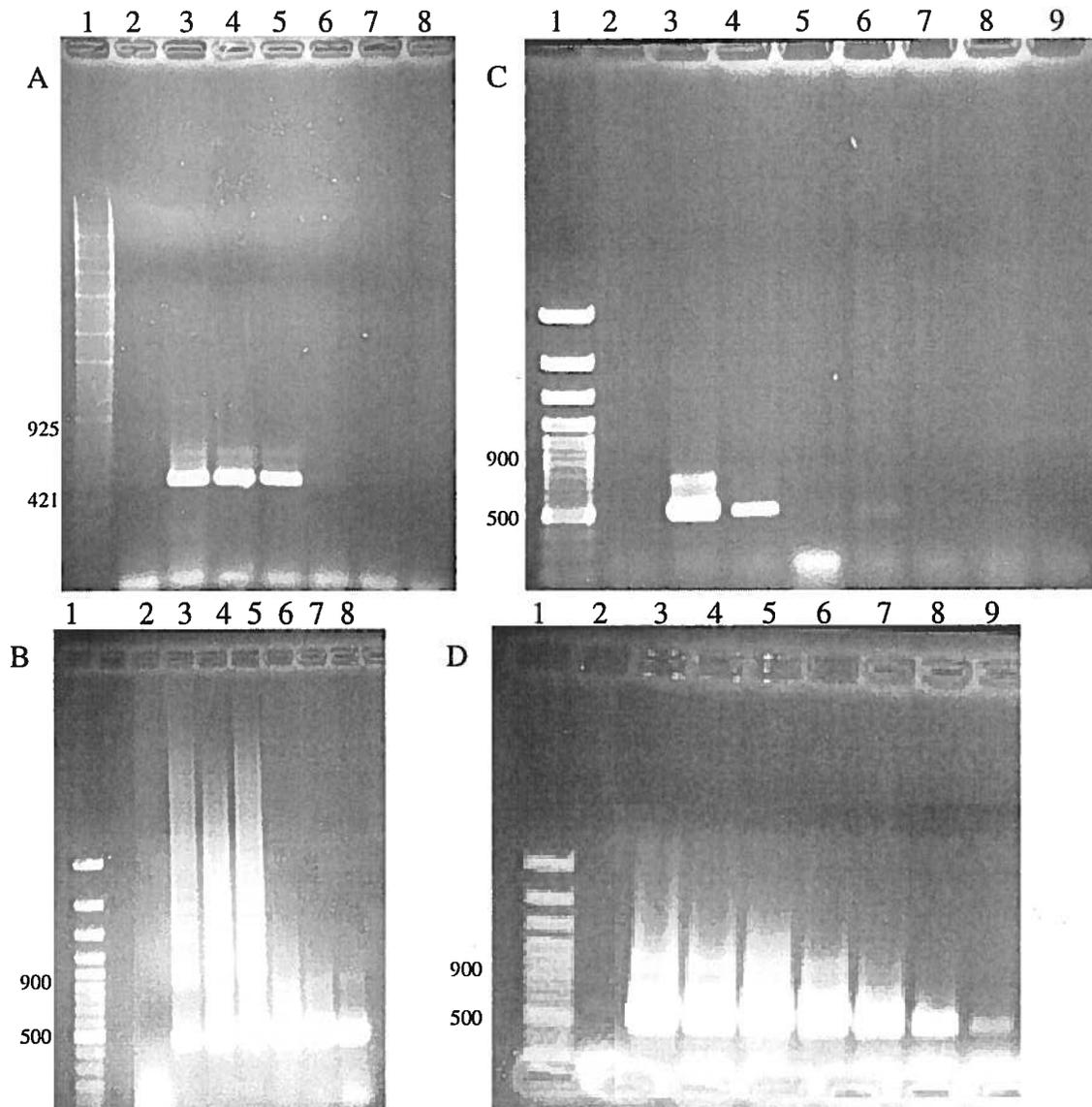


Figure 18 : Tests de sensibilité avec les ADN ovins seuls pour les PCR simples (A) et les PCR internes (B). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire λ Sty ou GeneRulerTM 100 bp DNA ladder Plus, Puits 2 : contrôle négatif, puits 3-8 : 10000, 1000, 500, 10, 1, 0.1 pg d'ADN, respectivement. Tests de sensibilité avec les ADN ovins mélangés avec 100 ng d'ADN bactérien pour les PCR simples (C) et les PCR internes (D). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire GeneRulerTM 100 bp DNA ladder Plus, Puits 2 : le contrôle négatif, Puits 3-9 : 10000, 1000, 500, 100, 10, 1, 0.1 pg d'ADN, respectivement.

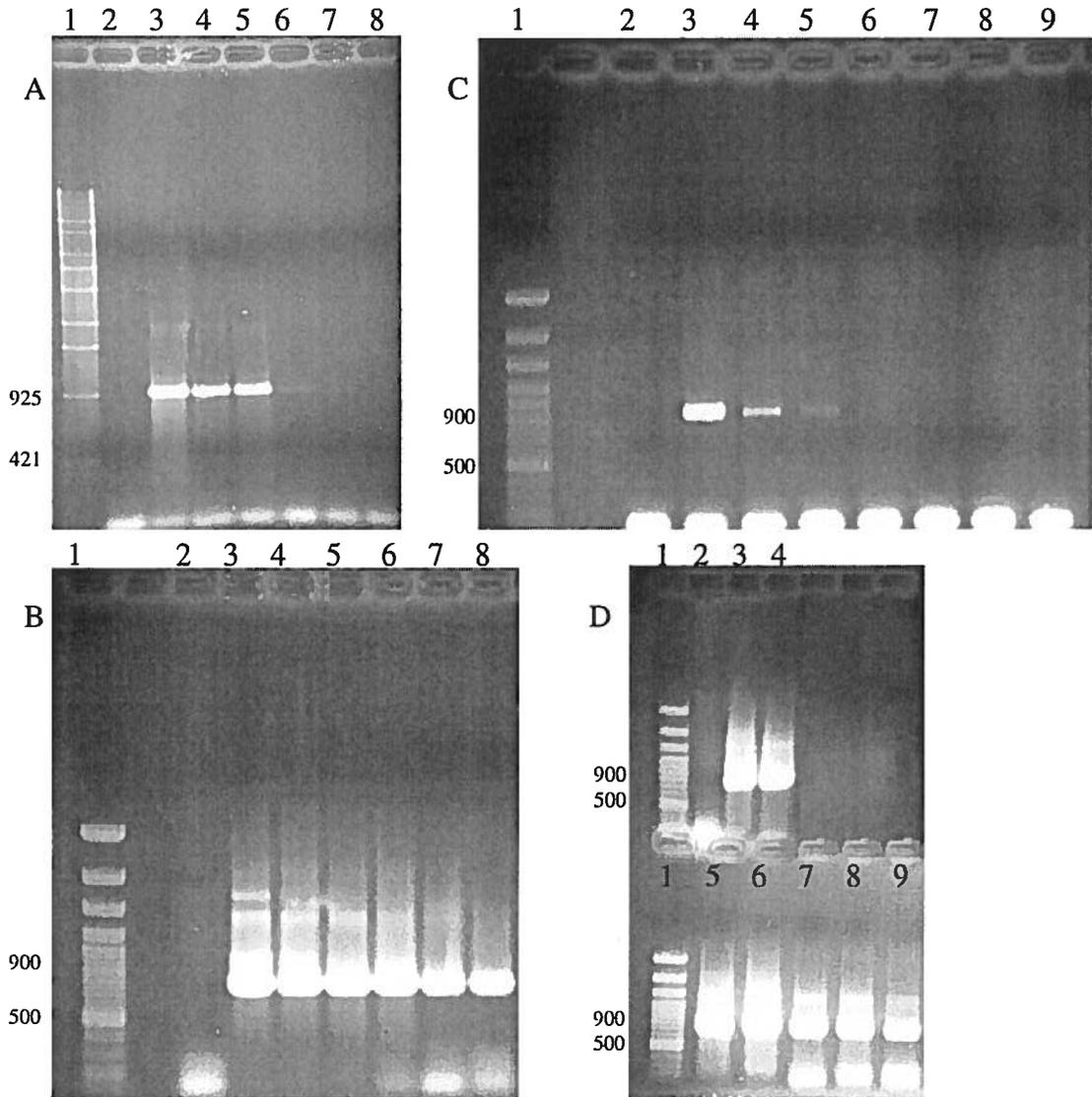


Figure 19 : Tests de sensibilité avec les ADN bovins seuls pour les PCR simples (A) et les PCR internes (B). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire λ Sty ou GeneRulerTM 100 bp DNA ladder Plus, Puits 2 : contrôle négatif, Puits 3-8 : 10000, 1000, 500, 10, 1, 0.1 pg d'ADN, respectivement. Tests de sensibilité avec les ADN bovins mélangés avec 100 ng d'ADN bactérien pour les PCR simples (C) et les PCR internes (D). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire GeneRulerTM 100 bp DNA ladder Plus, Puits 2 : le contrôle négatif, Puits 3-9 : 10000, 1000, 500, 100, 10, 1, 0.1 pg d'ADN, respectivement

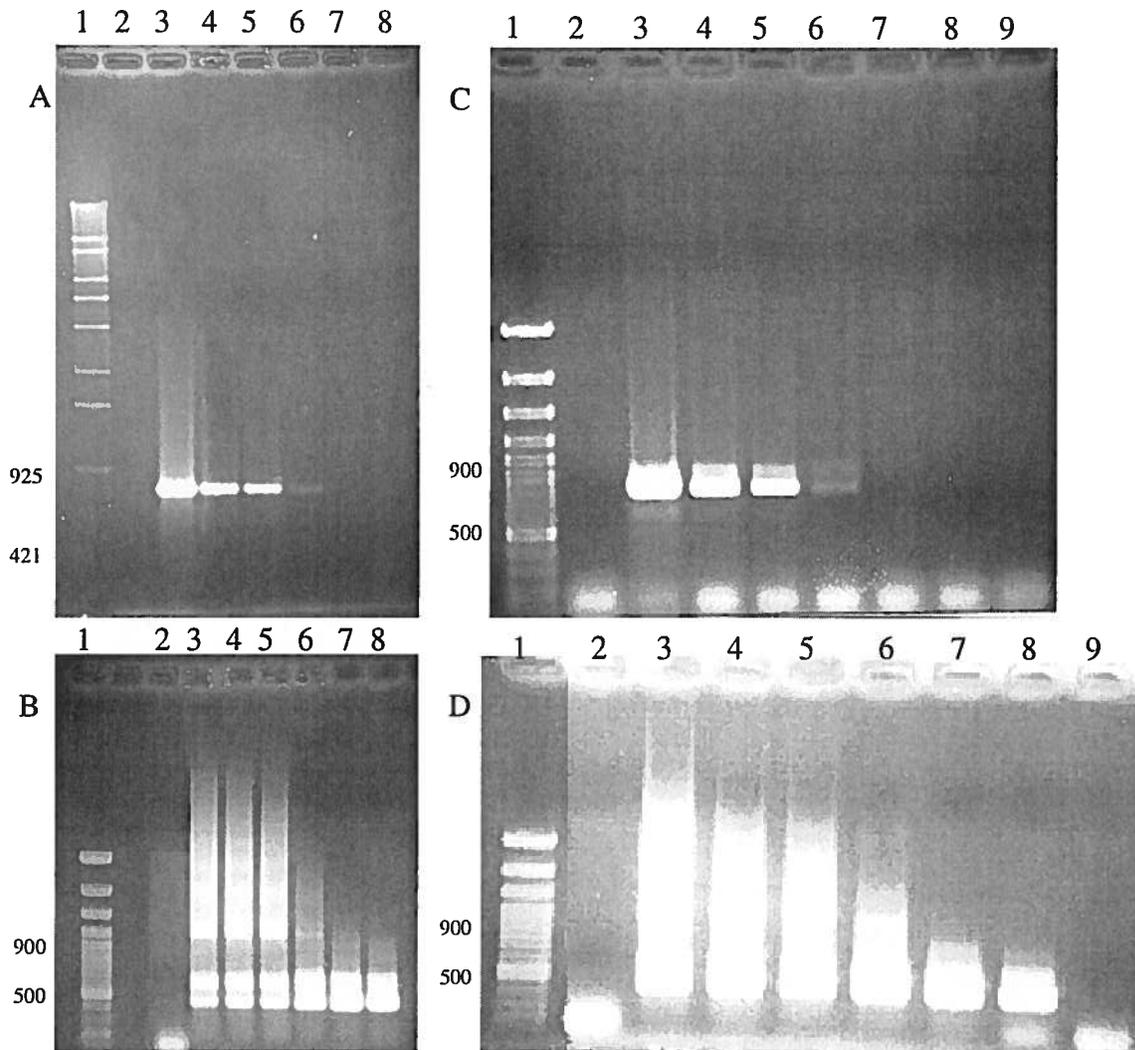


Figure 20 : Tests de sensibilité avec les ADN porcins seuls pour les PCR simples (A) et les PCR internes (B). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire λ Sty ou GeneRuler™ 100 bp ladder Plus, Puits 2 : contrôle négatif, Puits 3-8 : 10000, 1000, 500, 10, 1, 0.1 pg d'ADN, respectivement. Tests de sensibilité avec les ADN porcins mélangés avec 100 ng d'ADN bactérien pour les PCR simples (C) et les PCR internes (D). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Plus, Puits 2 : le contrôle négatif, Puits 3-9 : 10000, 1000, 500, 100, 10, 1, 0.1 pg d'ADN, respectivement.

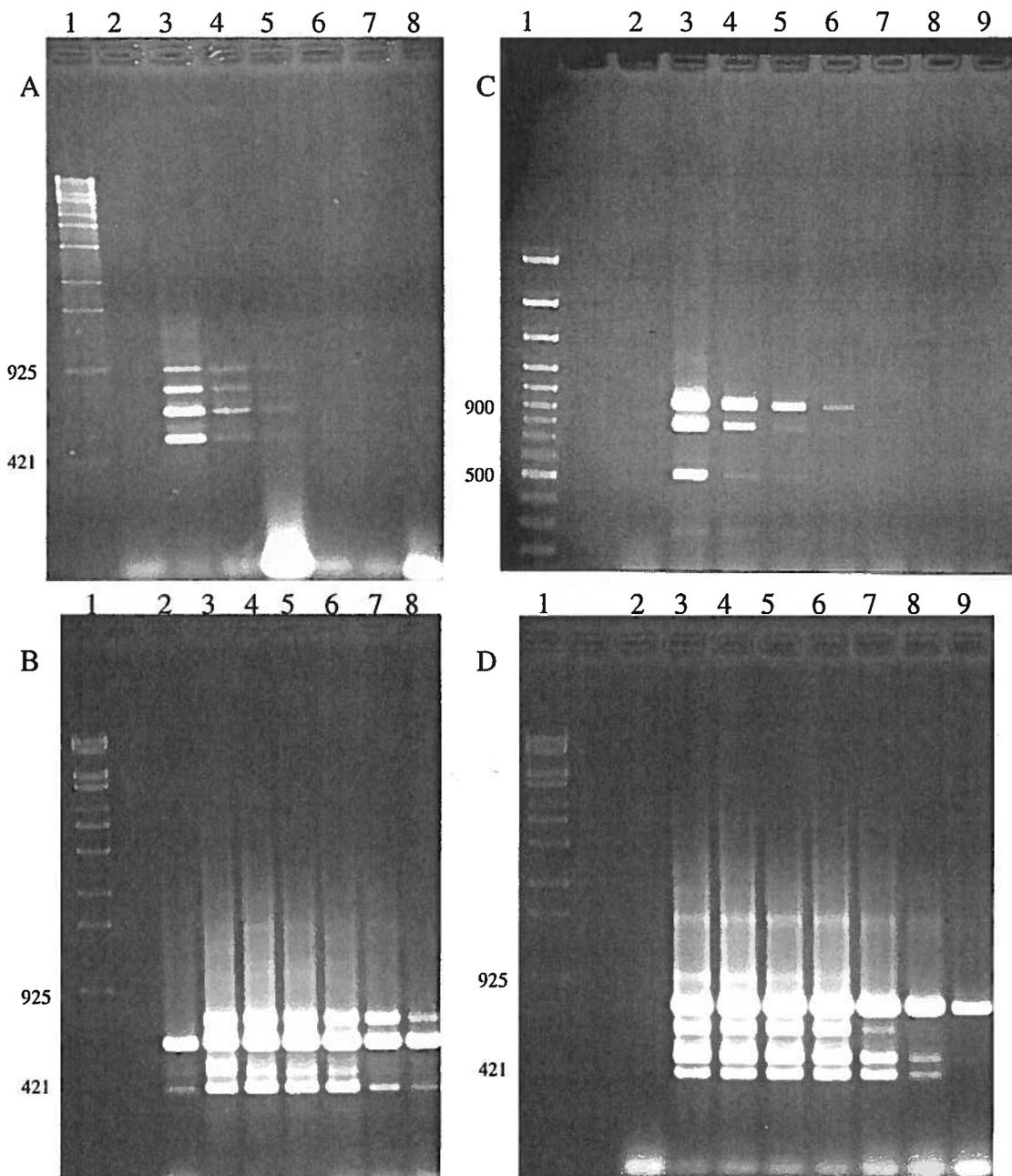


Figure 21 : Tests de sensibilité avec les ADN des 4 espèces pour les PCR multiplex (A) et les PCR multiplex internes (B). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire λ Sty, Puits 2 : contrôle négatif, Puits 3-8 : 10000, 1000, 500, 10, 1, 0.1 pg d'ADN, respectivement. Tests de sensibilité avec les ADN des 4 espèces mélangés avec 100 ng d'ADN bactérien pour les PCR multiplex (C) et les PCR multiplex internes (D). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire λ Sty ou GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Plus, Puits 2 : le contrôle négatif, Puits 3-9 : 10000, 1000, 500, 100, 10, 1, 0.1 pg d'ADN, respectivement.

Appendice C

Schéma de la station d'épuration de Fabreville

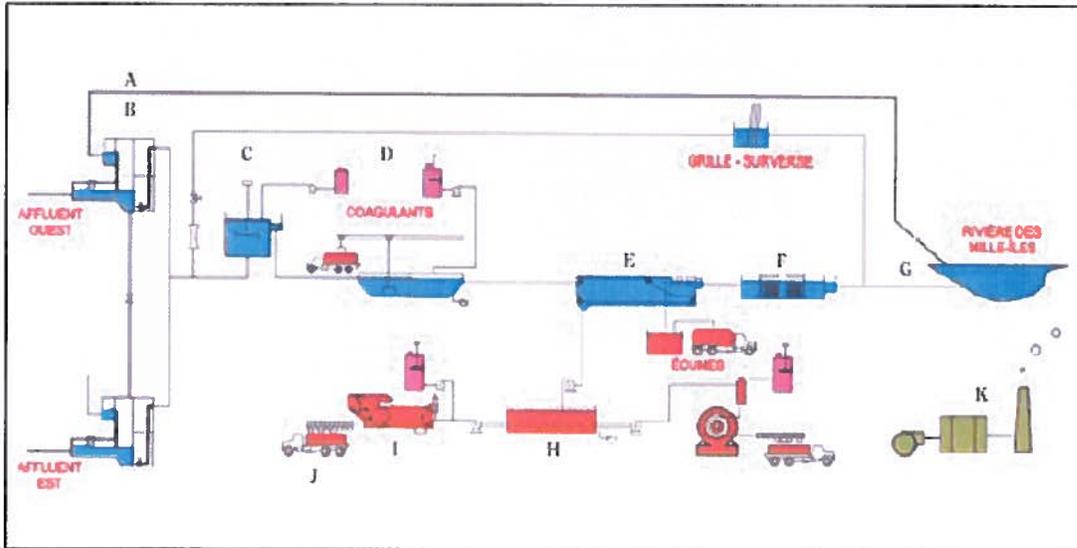


Figure 22 : Les traitements par lesquels l'eau usée de la station d'épuration de Fabreville passe avant d'être rejetée dans la rivière des Mille-Îles. **A)** Relèvement (pompage) des eaux usées. **B)** Dégrillage. **C)** Mélange rapide (ajout d'alun). **D)** Dessablage. **E)** Décantation. **F)** Désinfection U.V. **G)** Rejet des eaux. **H)** Stockage des boues. **I)** Déshydratation des boues. **J)** Disposition des boues. **K)** Traitement de l'air. (Service de la vie communautaire, 2003)

Appendice D

Cartes de la qualité de l'eau des rivières

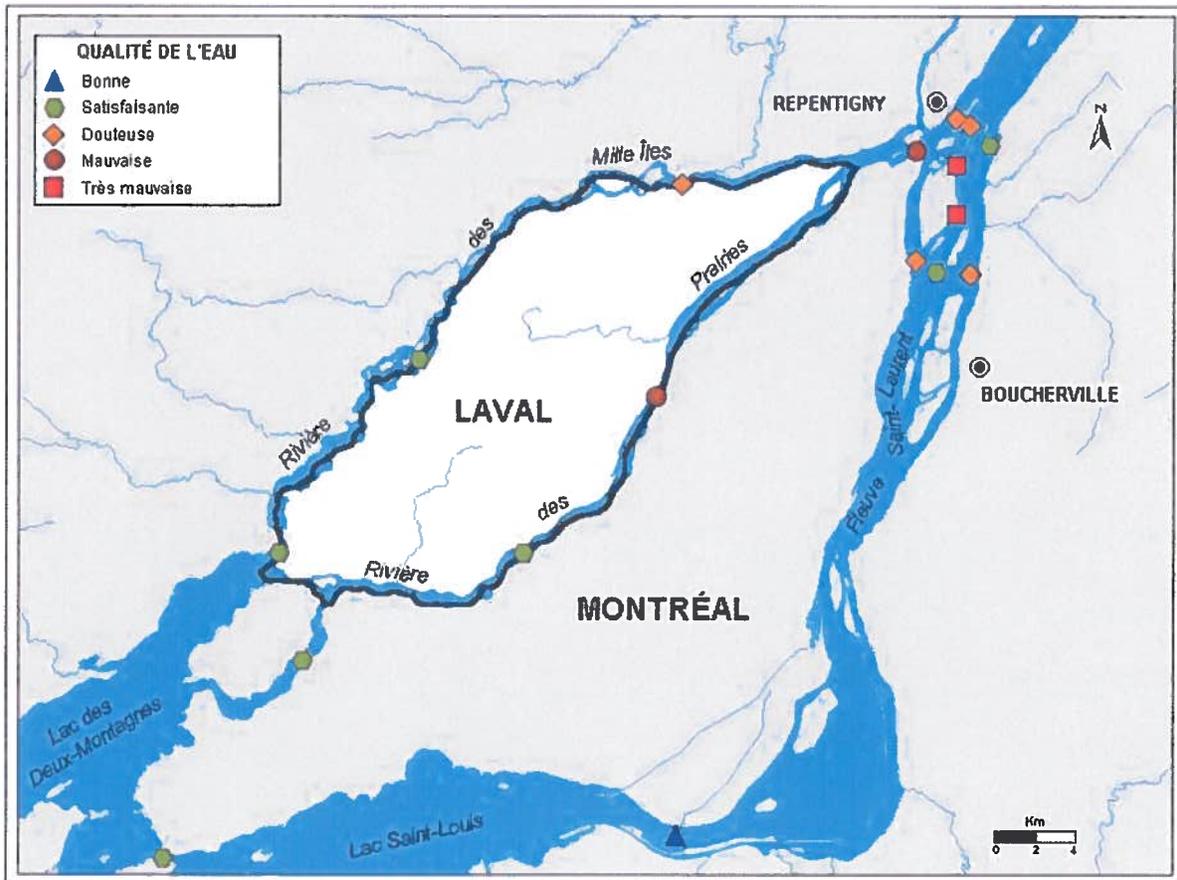


Figure 23 : Carte de la qualité de l'eau des rivières de la région de Laval élaborée au cours des étés 1995 à 1997 à partir de l'indice bactériologique et physico-chimique de l'eau (Ministère de l'Environnement, 2002)

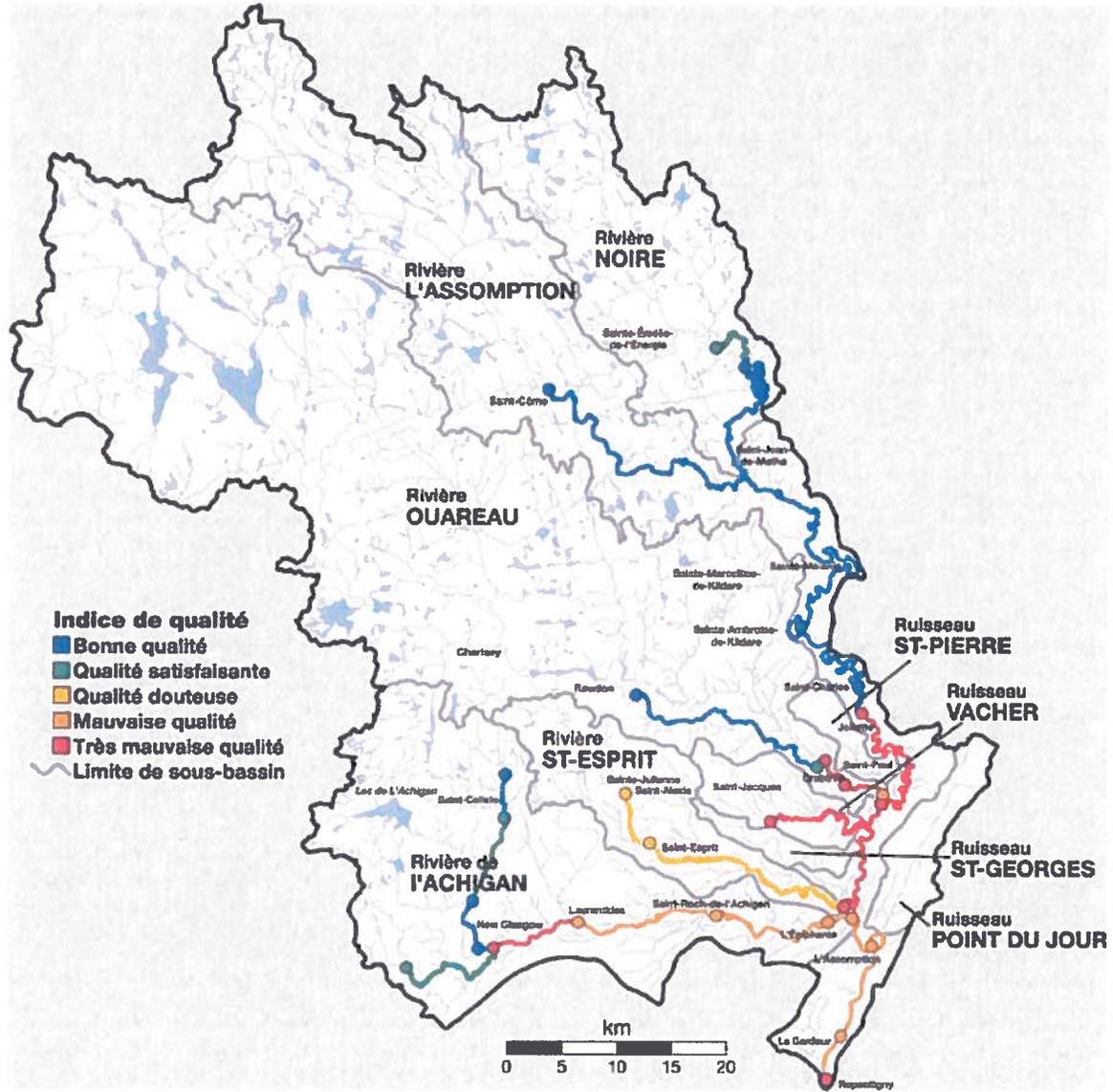


Figure 24 : Carte de la qualité des eaux du bassin versant de la rivière L'Assomption. (Environnement Québec, 2003)

Liste des références

ALEXANDER, R. J., et R. F. RAICHT. 1998. «Purification of total RNA from human stool samples». Dig Dis Sci, vol. 43, no. 12, p. 2652-2658.

AL-SOUD, W., A., et P. RADSTROM. 2000. «Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat». J Clin Microbiol, vol. 38, no. 12, p. 4463-4470.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 2002. «Waterborne pathogens and the diseases they cause». Microbiology Current Issues. http://www.microbeworld.org/html/cissues/waterq/wqual_1.htm

ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION. 1994. Dictionnaire de l'environnement: les termes normalisés. Paris: AFNOR.

ATLAS, R. M., et R. BARTHA. 1998. Microbial ecology: fundamentals and applications. 4th édition. Vol. 1: Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 694 p.

BAHIRATHAN, M., L. PUENTE et P. SEYFRIED. 1998. «Use of yellow-pigmented enterococci as a specific indicator of human and nonhuman sources of faecal pollution». Can J Microbiol, vol. 44, no. 11, p. 1066-1071.

BAL, A. S., et N. N. DHAGAT. 2001. «Upflow anaerobic sludge blanket reactor--a review». Indian J Environ Health, vol. 43, no. 2, p. 1-82.

BANDALETOVA, T., N. BAILEY, S. A. BINGHAM et A. LOKTIONOV. 2002. «Isolation of exfoliated colonocytes from human stool as a new technique for colonic cytology». APMIS, vol. 110, no. 3, p. 239-246.

BARWICK, R. S., D. A. LEVY, G. F. CRAUN, M. J. BEACH et R. L. CALDERON. 2000. «Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1997-1998». MMWR CDC Surveill Summ, vol. 49, no. 4, p. 1-21.

BATAILLE, M., K. CRAINIC, M. LETERREUX, M. DURIGON et P. DE MAZANCOURT. 1999. «Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation». Forensic Sci Int., vol. 99, no. 3, p. 165-170.

BELLAGAMBA, F., V. M. MORETTI, S. COMINCINI et F. VALFRE. 2001. «Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction--restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA». J Agric Food Chem, vol. 49, no. 8, p. 3775-3781.

BERNHARD, A. E., et K. G. FIELD. 2000. «Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes». Appl Environ Microbiol, vol. 66, no. 4, p. 1587-1594.

BERNHARD, A. E., T. GOYARD, M. T. SIMONICH et K. G. FIELD. 2003. «Application of a rapid method for identifying fecal pollution sources in a multi-use estuary». Water Res, vol. 37, no. 4, p. 909-913.

BERNSTEIN, B. B., J. F. GRIFFITH et S. B. WEISBERG. 2002. «Microbiological source tracking workshop: Summary of proceedings». Dans Microbial Source Tracking Workshop (Irvine, California).

BERSANI, J. 1989. Encyclopaedia UNIVERSALIS. Vol. 7: Dabrowska, Égypte. Paris, 1054 p.

BERTHELET, M., L. G. WHYTE et C. W. GREER. 1996. «Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns». FEMS Microbiol Lett, vol. 138, no. 1, p. 17-22.

BITTON, G. 1999. Wastewater microbiology. 2nd édition. Vol. 1: Wiley-Liss, 578 p.

BRUCE, K. D., W. D. HIORNS, J. L. HOBMAN, A. M. OSBORN, P. STRIKE et D. A. RITCHIE. 1992. «Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction». Appl Environ Microbiol, vol. 58, no. 10, p. 3413-3416.

CAMPBELL, N. A. 1995. Biologie. 3rd édition. Vol. 1: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1190 p.

CARSON, C. A., B. L. SHEAR, M. R. ELLERSIECK et A. ASFAW. 2001. «Identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals by ribotyping». Appl Environ Microbiol, vol. 67, no. 4, p. 1503-1507.

COLE, D., S. C. LONG et M. D. SOBSEY. 2003. «Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters». Appl Environ Microbiol, vol. 69, no. 11, p. 6507-6514.

DEUTER, R., S. PIETSCH, S. HERTEL et O. MULLER. 1995. «A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR». Nucleic Acids Res, vol. 23, no. 18, p. 3800-3801.

DOMBEK, P. E., L. K. JOHNSON, S. T. ZIMMERLEY et M. J. SADOWSKY. 2000. «Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources». Appl Environ Microbiol, vol. 66, no. 6, p. 2572-2577.

ENCYCLOPAEDIA UNIVERSALIS. 1999. Dictionnaire de l'écologie. Vol. 1. Paris, 1400 p.

EDGE, T., J. M. BYRNE, R. JOHNSON, W. ROBERTSON et R. STEVENSON. 2001. «Pathogènes d'origine hydrique». Dans Menaces pour les sources d'eau potable et les écosystèmes aquatiques au Canada: Institut National de Recherche sur les Eaux.

ELNIFRO, E. M., A. M. ASHSHI, R. J. COOPER et P. E. KLAPPER. 2000. «Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology». Clin Microbiol Rev, vol. 13, no. 4, p. 559-570.

ENVIRONNEMENT CANADA. 2003. «Recommandations canadiennes pour la qualité des eaux». www.ec.gc.ca/ceqg-rcqe/Francais/Ceqg/Water/default.cfm

ENVIRONNEMENT CANADA. 2004a. «Rapport de données quotidiennes pour août 2003 - Auteuil, Québec». http://climate.weatheroffice.ec.gc.ca/climateData/dailydata_f.html?timeframe=2&Prov=CA&StationID=5313&Year=2003&Month=8&Day=29

ENVIRONNEMENT CANADA. 2004b. «Site Web de l'eau douce: Faits intéressants». www.ec.gc.ca/water/fr/f_quickfacts.htm

ENVIRONNEMENT QUÉBEC. 2003. «Bassin versant de la rivière l'Assomption (1997) - Modifier nos pratiques agricoles...la priorité». Gouvernement du Québec. <http://www.menv.gouv.qc.ca/sol/pratiques-agri/assomption/index.htm>

FIELD, K. G., A. E. BERNHARD et T. J. BRODEUR. 2003. «Molecular approaches to microbiological monitoring: fecal source detection». Environ Monit Assess, vol. 81, no. 1-3, p. 313-326.

FIELD, K. G., E. C. CHERN, L. K. DICK, J. FUHRMAN, J. GRIFFITH, P. A. HOLDEN, M. G. LAMONTAGNE, J. LE, B. OLSON et M. T. SIMONICH. 2003. «A comparative study of culture-independent, library-independent genotypic methods of fecal source tracking». J Water Health, vol. 1, no. 4, p. 181-194.

FORD, T. E., et R. R. COLWELL. 1995. «A global decline in microbiological safety of water: a call for action». American Academy of Microbiology. Rapport.

GAVINI, F., A. M. POURCHER, C. NEUT, D. MONGET, C. ROMOND, C. OGER et D. IZARD. 1991. «Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origins». Int J Syst Bacteriol, vol. 41, no. 4, p. 548-557.

GORSKI, J. L., I. L. GONZALEZ et R. D. SCHMICKEL. 1987. «The secondary structure of human 28S rRNA: the structure and evolution of a mosaic rRNA gene». J Mol Evol, vol. 24, no. 3, p. 236-251.

GRIFFITH, J. F., S. B. WEISBERG et C. D. MCGEE. 2003. «Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples». J Water Health, vol. 1, no. 4, p. 141-151.

GROUPE TOTAL. «Mieux comprendre: L'eau douce - Les polluants de l'eau». www.environnement.totalfinaelf.com/th2/e4-3.htm

HA, H., et M. K. STENSTROM. 2000. «Methods to identify human and animal faecal pollution in water: a review (draft 3)». www.seas.ucla.edu/stenstro/Draft3n.pdf

HAGEDORN, C., J. B. CROZIER, K. A. MENTZ, A. M. BOOTH, A. K. GRAVES, N. J. NELSON et R. B. RENEAU. 2003. «Carbon source utilization profiles as a method to identify sources of faecal pollution in water». J Appl Microbiol, vol. 94, no. 5, p. 792-799.

HAGEDORN, C., S. L. ROBINSON, J. R. FILTZ, S. M. GRUBBS, T. A. ANGIER et R. B. RENEAU, JR. 1999. «Determining sources of fecal pollution in a rural Virginia watershed with antibiotic resistance patterns in fecal streptococci». Appl Environ Microbiol, vol. 65, no. 12, p. 5522-5531.

HARWOOD, V. J., J. WHITLOCK et V. WITHINGTON. 2000. «Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters». Appl Environ Microbiol, vol. 66, no. 9, p. 3698-3704.

HARWOOD, V. J., B. WIGGINS, C. HAGEDORN, R. D. ELLENDER, J. GOOCH, J. KERN, M. SAMADPOUR, A. C. CHAPMAN, B. J. ROBINSON et B. C. THOMPSON. 2003. «Phenotypic library-based microbial source tracking methods: efficacy in the California collaborative study». J Water Health, vol. 1, no. 4, p. 153-166.

HENEGARIU, O. 1997. «Troubleshooting for PCR and multiplex PCR». info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/Trblesht.html

HRUDEY, S. E., P. PAYMENT, P. M. HUCK, R. W. GILLHAM et E. J. HRUDEY. 2003. «A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world». Water Sci Technol, vol. 47, no. 3, p. 7-14.

IYENGAR, V., G. P. ALBAUGH, A. LOHANI et P. P. NAIR. 1991. «Human stools as a source of viable colonic epithelial cells». FASEB J, vol. 5, no. 13, p. 2856-2859.

JUTEAU, P., D. TREMBLAY, C. B. OULD-MOULAYE, J. G. BISAILLON et R. BEAUDET. 2004. «Swine waste treatment by self-heating aerobic thermophilic bioreactors». Water Res, vol. 38, no. 3, p. 539-546.

KAUFMANN, P., A. PFEFFERKORN, M. TEUBER et L. MEILE. 1997. «Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR». Appl Environ Microbiol, vol. 63, no. 4, p. 1268-1273.

KHATIB, L. A., Y. L. TSAI et B. H. OLSON. 2002. «A biomarker for the identification of cattle fecal pollution in water using the LTIIa toxin gene from enterotoxigenic *Escherichia coli*». Appl Microbiol Biotechnol, vol. 59, no. 1, p. 97-104.

KÖSTER, W., T. EGLI et A. RUST. 2002. «Des agents pathogènes dans l'eau (potable)?». EAWAG news, vol., no. 53, p. 26-28.

KUO, B. A., I. L. GONZALEZ, D. A. GILLESPIE et J. E. SYLVESTER. 1996. «Human ribosomal RNA variants from a single individual and their expression in different tissues». Nucleic Acids Res, vol. 24, no. 23, p. 4817-4824.

LAHIFF, S., M. GLENNON, L. O'BRIEN, J. LYNG, T. SMITH, M. MAHER et N. SHILTON. 2001. «Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meta and bone meal (MBM)». Mol Cell Probes, vol. 15, no. 1, p. 27-35.

LANGENDIJK, P. S., F. SCHUT, G. J. JANSEN, G. C. RAANGS, G. R. KAMPHUIS, M. H. WILKINSON et G. W. WELLING. 1995. «Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium spp.* with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples». Appl Environ Microbiol, vol. 61, no. 8, p. 3069-3075.

LEBLANC, N. J. 1990. L'eau aujourd'hui: planète bleue, planète grise. Vol. IV. Georg Editeur SA. Genève: Société suisse pour la protection de l'environnement, 136 p.

LE CONSEIL CANADIEN DES MINISTRES DE L'ENVIRONNEMENT. 2002. «Recommandations: définir des seuils sécuritaires». www.ccme.ca/sourcetotap/

guidelines.fr.html

LECLERC, H., L. SCHWARTZBROD et E. DEI-CAS. 2002. «Microbial agents associated with waterborne diseases». Crit Rev Microbiol, vol. 28, no. 4, p. 371-409.

LEE, J. C., et J. G. CHANG. 1994. «Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification». Forensic Sci Int, vol. 67, no. 2, p. 103-107.

LEE, S. H., D. A. LEVY, G. F. CRAUN, M. J. BEACH et R. L. CALDERON. 2002. «Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1999-2000». Morbidity and Mortality Weekly Report Surveill Summ, vol. 51, no. 8, p. 1-47.

LENNTECH. 2004a. «FAQ - effets sur la santé des polluants de l'eau». www.lenntech.com/français/faq-effet-polluants-sante.htm

LENNTECH. 2004b. «FAQ sur la pollution de l'eau». www.lenntech.com/français/faq-pollution-eau.htm

MACHIELS, B. M., T. RUERS, M. LINDHOUT, K. HARDY, T. HLAVATY, D. D. BANG, V. A. SOMERS, C. BAETEN, M. VON MEYENFELDT et F. B. THUNNISSEN. 2000. «New protocol for DNA extraction of stool». Biotechniques, vol. 28, no. 2, p. 286-290.

MADEN, B. E., C. L. DENT, T. E. FARRELL, J. GARDE, F. S. MCCALLUM et J. A. WAKEMAN. 1987. «Clones of human ribosomal DNA containing the complete 18 S-rRNA and 28 S-rRNA genes. Characterization, a detailed map of the human ribosomal transcription unit and diversity among clones». Biochem J, vol. 246, no. 2, p. 519-527.

MAINVILLE, S. 2004. «Étude sur les cas de pluie abondante et de pluie torrentielle au Québec et guide opérationnel de prévision». Rapport Environnement Canada. Montréal. meted.ucar.edu/norlat/cases/tech_rain_quebec/etudepluie_guide_1.pdf

MALAKOFF, D. 2002. «Water quality. Microbiologists on the trail of polluting bacteria». Science, vol. 295, no. 5564, p. 2352-2353.

MARA, D. D., et J. I. ORAGUI. 1983. «Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution». J Appl Bacteriol, vol. 55, no. 2, p. 349-357.

MCCALLUM, F. S., et B. E. MADEN. 1985. «Human 18 S ribosomal RNA sequence inferred from DNA sequence. Variations in 18S sequences and secondary modification patterns between vertebrates». Biochem J, vol. 232, no. 3, p. 725-733.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT. 2002. «Portrait régional de l'eau - Laval (région administrative 13)». Environnement Québec. <http://www.menv.gouv.qc.ca/eau/regions/region13/13-laval.htm>

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT. 1989. «L'eau potable au Québec: un premier bilan de sa qualité». Rapport

MONTIEL-SOSA, J. F., E. RUIZ-PESINI, J. MONTOYA, P. RONCALES, M. J. LOPEZ-PEREZ et A. PEREZ-MARTOS. 2000. «Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA». J Agric Food Chem, vol. 48, no. 7, p. 2829-2832.

MYODA, S. P., C. A. CARSON, J. J. FUHRMANN, B. K. HAHM, P. G. HARTEL, H. YAMPARA-LQUISE, L. JOHNSON, R. L. KUNTZ, C. H. NAKATSU, M. J. SADOWSKY et M. SAMADPOUR. 2003. «Comparison of genotypic-based microbial source tracking methods requiring a host origin database». J Water Health, vol. 1, no. 4, p. 167-180.

NAITO, E., K. DEWA, H. YMANOUCHI et R. KOMINAMI. 1992. «Ribosomal ribonucleic acid (rRNA) gene typing for species identification». J Forensic Sci, vol. 37, no. 2, p. 396-403.

NEBRA, Y., X. BONJOCH et A. R. BLANCH. 2003. «Use of *Bifidobacterium dentium* as an indicator of the origin of fecal water pollution». Appl Environ Microbiol, vol. 69, no. 5, p. 2651-2656.

NOBLE, R. T., S. M. ALLEN, A. D. BLACKWOOD, W. CHU, S. C. JIANG, G. L. LOVELACE, M. D. SOBSEY, J. R. STEWART et D. A. WAIT. 2003. «Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial source tracking comparison study». Journal of Water and Health, vol. 1, no. 4, p. 195-208.

PALVA, T. K., et E. T. PALVA. 1985. «Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by alkaline extraction». FEBS Lett, vol. 192, no. 2, p. 267-270.

PARDO, D., J. M. LUCIANI et A. STAHL. 1975. «[Localization of the genes of 28S and 18S RNA in human somatic chromosomes by in situ hybridization]». Ann Genet, vol. 18, no. 2, p. 105-109.

PARODI, B., O. ARESU, D. BINI, R. LORENZINI, F. SCHENA, P. VISCONTI, M. CESARO, D. FERRERA, V. ANDREOTTI et T. RUZZON. 2002. «Species identification and confirmation of human and animal cell lines: a PCR-based method». Biotechniques, vol. 32, no. 2, p. 432-434, 436, 438-440.

PARSON, W., K. PEGORARO, H. NIEDERSTATTER, M. FOGER et M. STEINLECHNER. 2000. «Species identification by means of the cytochrome b gene». Int J Legal Med, vol. 114, no. 1-2, p. 23-28.

PARVEEN, S., K. M. PORTIER, K. ROBINSON, L. EDMISTON et M. L. TAMPLIN. 1999. «Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution». Appl Environ Microbiol, vol. 65, no. 7, p. 3142-3147.

PAYMENT, P., F. AFFOYON et M. TRUDEL. 1988. «Detection of animal and human enteric viruses in water from the Assomption River and its tributaries». Can J Microbiol, vol. 34, no. 8, p. 967-973.

PETIT, F., S. CRAQUELIN, J. GUESPIN-MICHEL et C. BUFFET-JANVRESSE. 1999. «Nucleic acid extraction from polluted estuarine water for detection of viruses and bacteria by PCR and RT-PCR analysis». Res Microbiol, vol. 150, no. 2, p. 143-151.

PRESCOTT, HARLEY et KLEIN. 1995. Microbiologie. 2nd édition. Vol. 1. Bruxelles, 1014 p.

REISS, R. A., et B. RUTZ. 1999. «Quality control PCR: a method for detecting inhibitors of Taq DNA polymerase». Biotechniques, vol. 27, no. 5, p. 920-922, 924-926.

RITTER, K. J., E. CARRUTHERS, C. A. CARSON, R. D. ELLENDER, V. J. HARWOOD, K. KINGSLEY, C. NAKATSU, M. SADOWSKY, B. SHEAR, B. WEST, J. E. WHITLOCK, B. A. WIGGINS et J. D. WILBUR. 2003. «Assessment of statistical methods used in library-based approaches to microbial source tracking». J Water Health, vol. 1, no. 4, p. 209-223.

RITTER, L., K. SOLOMON, P. SIBLEY, K. HALL, P. KEEN, G. MATTU et B. LINTON. 2002. «Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry». J Toxicol Environ Health A, vol. 65, no. 1, p. 1-142.

ROSE, J. B., et D. J. GRIMES. 2001. «Reevaluation of microbial water quality: powerful new tools for detection and risk assessment». American Academy of Microbiology, Washington D.C.

SAINT-LAURENT VISION 2000. 2002. «Fiche d'information - La phase II de Saint-Laurent Vision 2000: Les tributaires». www.slv2000.qc.ca/communiqués/phase2/fi_tributaires_f.htm

SALTER, D. W. 2002. «Evaluation of a polymerase chain reaction method for determining the source of fecal contamination of consumable and environmental Alabama waters». Research Grant Application. facstaff.uwa.edu/dsalter/uwagrant%202003.htm

SAMBROOK, J., P. MACCALLUM et D. RUSSELL. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. third edition édition. New York: Cold Spring Harbor.

SCARDOVI, V., B. SGORBATI et G. ZANI. 1971. «Starch gel electrophoresis of fructose-6-phosphate phosphoketolase in the genus *Bifidobacterium*». J Bacteriol, vol. 106, no. 3, p. 1036-1039.

SCOTT, T. M., J. B. ROSE, T. M. JENKINS, S. R. FARRAH et J. LUKASIK. 2002. «Microbial source tracking: current methodology and future directions». Appl Environ Microbiol, vol. 68, no. 12, p. 5796-5803.

SERVICE DE LA VIE COMMUNAUTAIRE, D. L. C. E. D. C. 2003. «Dépliant de la station d'épuration de Fabreville».

SIMMONS, G. M., D. F. WAYE, S. HERBEIN, S. MYERS et E. WALKER. 2000. «Estimating nonpoint fecal coliform sources in Northern Virginia's Four Mile Run watershed». Proceedings of the Virginia Water Research Symposium 2000. Rapport

SIMPSON, J. M., J. W. SANTO DOMINGO et D. J. REASONER. 2002. «Microbial source tracking: state of the science». Environ Sci Technol, vol. 36, no. 24, p. 5279-5288.

SINTON, L. W., R. K. FINLAY et D. J. HANNAH. 1998. «Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review». New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research abstracts, vol. 32, no., p. 323-348.

SOTERIOU, B., R. A. FISHER, I. M. KHAN, A. M. KESSLING, L. C. ARCHARD et L. BULUWELA. 1995. «Conserved gene sequences for species identification: PCR analysis of the 3' UTR of the SON gene distinguishes human and other mammalian DNAs». Forensic Sci Int, vol. 73, no. 3, p. 171-181.

STATISTIQUE CANADA. 2003. «L'activité humaine et l'environnement - Statistiques annuelles 2003». Rapport. www.statcan.ca/francais/preview/16-201-XIF/P0000316-201-XIF.pdf

STEWART, J. R., R. D. ELLENDER, J. A. GOOCH, S. JIANG, S. P. MYODA et S. B. WEISBERG. 2003. «Recommendations for microbial source tracking: lessons from a methods comparison study». J Water Health, vol. 1, no. 4, p. 225-231.

TANNOCK, G. W. 2001. «Molecular assessment of intestinal microflora». Am J Clin Nutr, vol. 73, no. 2 Suppl, p. 410S-414S.

TROCHIMCHUK, T., J. FOTHERINGHAM, E. TOPP, H. SCHRAFT et K. T. LEUNG. 2003. «A comparison of DNA extraction and purification methods to detect *Escherichia coli* O157:H7 in cattle manure». J Microbiol Methods, vol. 54, no. 2, p. 165-175.

WELTER, C., E. MEESE et N. BLIN. 1988. «Rapid step-gradient purification of mitochondrial DNA». Mol Biol Rep, vol. 13, no. 2, p. 117-120.

YAMAMOTO, T., M. MOROTOMI et R. TANAKA. 1992. «Species-specific oligonucleotide probes for five *Bifidobacterium* species detected in human intestinal microflora». Appl Environ Microbiol, vol. 58, no. 12, p. 4076-4079.

ZIMMERMAN, E. G., D. R. AKINS, J. V. PLANZ et M. J. SCHURR. 1988. «A rapid procedure for isolating mitochondrial DNA». Gene Anal Tech, vol. 5, no. 5, p. 102-104.