

INRS – Institut Armand – Frappier

Identification de la source de contamination fécale dans l'eau par la détection
de l'ADN mitochondrial

Par

Randa Kortbaoui

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

Rolf Morosoli, 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

RESUME

L'objectif de ce projet de recherche débuté en 2005 était d'optimiser une nouvelle méthode moléculaire capable d'identifier les sources de pollution fécale humaine et animale dans l'eau. À l'opposé de nombreuses approches déjà expérimentées qui détectent des microorganismes indicateurs ou des virus et des protozoaires associés à certaines espèces, la méthode proposée ici cible un marqueur génétique des cellules humaines et animales excrété via les fèces. L'ADN mitochondrial a été choisi comme cible compte tenu des différents avantages qu'il possède: sa présence en plusieurs copies dans la cellule, sa structure circulaire, sa durée de vie, etc. Pour ce faire, un protocole d'amplification par PCR et PCR interne a été élaboré avec des amorces ciblant spécifiquement les ADNs mitochondriaux humain, ovin, bovin, porc et de poulet. Ces amorces spécifiques ont ensuite été testées avec les ADNs extraits d'eaux usées provenant de la station d'épuration de Fabreville, de la station d'épuration d'Auteuil ainsi sur les eaux des rivières de l'Assomption et des Mille-Îles. Le protocole d'échantillonnage a été simplifié en passant par une étape de filtration suivie d'une extraction rapide de l'ADN total par broyage avec des billes de verre. La contamination fécale de l'eau a été déterminée dans certaines rivières et plusieurs espèces ont été détectées dans les échantillons d'eaux usées. Il a été démontré que le PCR interne est capable de détecter plus d'espèces que le PCR simple. Des amorces universelles ont aussi été développées pour cibler les cinq espèces en même temps. Ces amorces ont permis en une seule réaction de PCR d'amplifier l'ADN mitochondrial présent dans l'eau. La discrimination des espèces a été faite par des expériences de dot blot. Pour ce faire, des oligonucléotides spécifiques à chaque espèce ont été fixés sur des membranes de nylon. Le produit de PCR (préalablement marqué) a servi de sonde pour une hybridation avec ces oligonucléotides. Une analyse comparative entre la technique dot blot et celle du PCR avec amorces spécifiques a révélé les mêmes résultats sur les échantillons d'eau. En conclusion, cette méthode est simple, rapide, fiable et efficace pour identifier la source de la contamination fécale dans l'eau.

Étudiante

Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Richard Villemur, qui m'a fait confiance pour mener à bien ce projet de maîtrise. Il m'a fourni de précieux conseils, il m'a fait bénéficier de son expérience et de ses connaissances, et s'est également montré très disponible tout au long de cette période.

J'adresse également un remerciement à mon codirecteur Pierre Payment pour son support et ses conseils. Je voudrai aussi remercier tous les membres du groupe en environnement de l'Institut Armand-Frappier qui m'ont parfois assisté dans mes recherches, mes présentations et fourni d'intéressantes informations.

Il faut aussi que j'inclue dans mes remerciements le Réseau Canadien de l'Eau, qui a financé en partie cette recherche ainsi toutes les personnes qui ont contribué à l'obtention des échantillons.

Finalement, je remercie mon conjoint, Joseph, pour m'avoir encouragé et supporté tout au long de ma maîtrise. Je remercie aussi mes parents pour m'avoir encouragé à poursuivre mes études bien que je sois loin d'eux.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	II
REMERCIEMENTS.....	III
TABLE DES MATIERES	IV
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES ABREVIATIONS	X
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1.1 Différentes sources de contamination de l'eau	3
1.2 Indicateurs d'une contamination fécale.....	3
1.2.1 Les coliformes totaux	4
1.2.2 Les bactéries Bifidobacterium.....	6
1.2.3 Les virus bactériens et entériques.....	7
1.2.4 Parasites.....	7
1.2.5 Autres indicateurs.....	8
1.3 Méthodes de détection de contamination fécale	9
1.3.1 Méthodes de détection avec banque de matériel microbien.....	9
1.3.2 Méthodes de détection sans banque de matériel microbien	10
1.3.3 Puces à ADN	11
1.4 L'ADN mitochondrial, un indicateur de choix	11
CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES	13
2.1 Échantillons.....	13
2.2 Concentration de la matière en suspension	13
2.2.1 Filtration	13
2.2.2 Centrifugation.....	14
2.3 Extraction d'ADN	14
2.4 Amplification PCR et PCR interne	15
2.5 Electrophorèse sur gel d'agarose.....	15
2.6 Dot blot.....	16

2.6.1	Fixation d'oligonucléotides sur membranes	16
2.6.2	Marquage d'amplicons avec la digoxigénine	16
2.6.3	Préhybridation	17
2.6.4	Hybridation.....	17
2.6.5	Révélation au NBT/BCIP.....	17
CHAPITRE 3 : RESULTATS.....		18
3.1	Concentration de la matière en suspension dans l'eau par filtration	18
3.2	Élaboration des amorces spécifiques.....	20
3.3	Gradient PCR.	24
3.4	Tests de sensibilité.	27
3.5	Amplification des gènes de 16S ARN ribosomiaux dans les échantillons d'eaux...	30
3.6	Eau de rivières.....	31
3.7	Eaux usées	33
3.8	Lisier de porc.....	35
3.9	Persistence de l'ADN	36
3.10	Élaboration des amorces universelles	38
3.11	Élaboration des oligonucléotides	42
3.12	Application du dot blot.....	49
3.13	Hybridation ADN/ADN des tissus spécifiques.....	51
3.14	Hybridation ADN/ADN des échantillons d'eaux.....	56
3.14.1	Région Umito1	56
3.14.2	Région Umito2	58
3.14.3	Région Umito2'	60
3.14.4	Région Umito3	62
3.14.5	Rivière de Mille-Îles.....	65
CHAPITRE 4: DISCUSSION.....		66
4.1	Choix des amorces spécifiques	66
4.2	Choix des rivières.....	66
4.3	Amplification de l'ADN mitochondrial dans l'eau des rivières	67
4.5	Amplification de l'ADN mitochondrial dans les eaux usées	68
4.6	Amplification de l'ADN mitochondrial en présence d'ADN bactérien.....	69

4.7	Détection et persistance de l'ADN après quelques mois	70
4.8	Une méthode différente des méthodes traditionnelles	70
4.9	Amélioration et optimisation de la méthode détectant l'ADN mitochondrial	71
4.10	Limites et avantages de la méthode.....	72
4.11	Choix de la technique hybridation ADN-ADN ou dot blot	72
4.12	Choix des sondes.....	73
4.13	Choix des oligonucléotides	74
4.14	Facteurs influençant l'hybridation	74
4.15	Comparaison des résultats du PCR avec les résultats du dot blot.....	75
4.16	Limite et qualité du dot blot	75
4.17	Durée de vie de la cible	76
4.18	Temps d'exécution	76
4.19	Coût.....	77
4.20	Perspectives.....	77
CONCLUSION.....		79
REFERENCES.....		81
ANNEXE 1 Alignement des séquences mitochondriales		93
ANNEXE 2 Carte des différentes régions d'échantillonnage.....		103

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Vérification de la qualité de l'ADN extrait	19
Figure 2 : Amplification PCR de l'ADN mitochondrial à partir de l'ADN total extrait des cinq espèces avec les différentes amorces spécifiques.....	22
Figure 3 : Amplification PCR interne de l'ADN mitochondrial à partir de 2 µl d'ADN du premier produit PCR avec les différentes amorces internes spécifiques.	23
Figure 4 : Amplification PCR avec des températures d'hybridation différentes.	25
Figure 5 : Alignement des séquences mitochondriales de la souris et de l'humain.....	26
Figure 6 : Tests de sensibilité pour chaque paire d'amorces spécifiques (humain, mouton, bœuf, porc et poulet)	29
Figure 7 : PCR de l'ADN extrait d'eau de rivières et d'eau usée avec les amorces ARNr 16S bactériens.....	30
Figure 8 : Amplification d'ADN mitochondrial de 500 µl du lisier de porc brut.	35
Figure 9 : PCR internes avec l'ADN extrait après quelques mois de conservation des échantillons d'eau à 4°C.....	37
Figure 10 : Amplification PCR de l'ADN mitochondrial à partir de l'ADN total extrait des cinq espèces avec les différentes amorces universelles	40
Figure 11 : Amplification PCR à des températures d'hybridation différentes et avec les amorces Umito 1	41
Figure 12 : Alignement des cinq séquences mitochondriales ayant conduit aux amorces universelles Umito 1.....	43
Figure 13 : Alignement des cinq séquences mitochondriales ayant conduit aux amorces universelles Umito 2 et Umito 2'	44
Figure 14 : Alignement des séquences mitochondriales ayant conduit aux amorces universelles Umito 3.....	45
Figure 15 : Modèle d'une membrane en nylon utilisée pour l'expérience du dot blot	50
Figure 16 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir des PCR marqués au DIG contenant la paire d'amorces Umito 1 et de l'ADN extrait de chaque espèce.	52

Figure 17 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir des PCR marqués au DIG contenant la paire d'amorces Umito 2 et de l'ADN de chaque espèce.	53
Figure 18 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir des PCR marqués au DIG contenant la paire d'amorces Umito 2' et de l'ADN de chaque espèce.	54
Figure 19 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir des PCR marqués au DIG contenant la paire d'amorces Umito 3 et de l'ADN de chaque espèce.	55
Figure 20 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir de l'ADN extrait de différents échantillons d'eaux A1, F1, F3, As1 et MI et les amorces Umito 1.	57
Figure 21 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir de l'ADN extrait de différents échantillons d'eaux A2, F2, F3, As1 et MI et les amorces Umito 2.	59
Figure 22 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir de l'ADN extrait de différents échantillons d'eaux A1, F1, F3, As1 et MI et les amorces Umito 2'.	61
Figure 23 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir de l'ADN extrait de différents échantillons d'eaux A2, F2, F3, As1 et MI et les amorces Umito 3.	63
Figure 24 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir de l'ADN extrait de l'eau de rivière de Mille-Îles au niveau de Sainte Rose.	65
Figure 25 : Alignement des séquences mitochondriales des cinq espèces.	102
Figure 26 : Carte représentant les diverses régions d'échantillonnages.	103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : liste des amorces pour PCR simple et PCR interne. (Nested = N).	21
Tableau 2 : Résultats obtenus à partir des amplifications faites en présence des amorces spécifiques simples et de l'ADN extrait des eaux de rivières.	32
Tableau 3 : Résultats obtenus à partir des amplifications faites en présence des amorces spécifiques internes et de 2 µl du produit du premier PCR.....	32
Tableau 4 : Résultats obtenus à partir des amplifications faites en présence des amorces spécifiques simples et de l'ADN extrait des eaux usées.	34
Tableau 5 : Résultats obtenus à partir des amplifications faites en présence des amorces spécifiques internes et de 2 µl du produit du premier PCR.....	34
Tableau 6 : Présence ou absence de l'ADN mitochondrial dans l'ADN des échantillons d'eau après quelques mois de conservation	37
Tableau 7 : Liste des amorces universelles	39
Tableau 8 : Séquence des oligonucléotides spécifiques de la région 1	46
Tableau 9 : Séquence des oligonucléotides spécifiques de la région 2.....	47
Tableau 10 : Séquence des oligonucléotides spécifiques de la région 3.....	48
Tableau 11 : Analyse comparative entre le PCR interne et le dot blot réalisée avec la sonde contenant la paire d'amorces Umito1 et de l'ADN extrait des échantillons... ..	58
Tableau 12 : Analyse comparative entre le PCR interne et le dot blot réalisée avec la sonde contenant la paire d'amorces Umito2 et l'ADN extrait de certains échantillons d'eau.....	60
Tableau 13 : Analyse comparative entre le PCR interne et le dot blot réalisé avec la sonde contenant la paire d'amorces Umito2'et l'ADN extrait de certains échantillons.....	62
Tableau 14 : Analyse comparative entre le PCR interne et le dot blot réalisée avec la sonde contenant la paire d'amorces Umito3 et l'ADN extrait de certains échantillons.....	64

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNr : acide ribonucléique ribosomal

BOX-PCR : réaction en chaîne de la polymérase ciblant des éléments répétés extragéniques

BSA : albumine de sérum de bœuf

cfu : unité formatrice de colonie

DBO : demande biologique en oxygène

DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

dNTP : désoxynucléosidetriphosphates

dUTP : désoxyuridinetriphosphate

EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique

ERIC-PCR : réaction en chaîne de la polymérase ciblant des séquences consensus

intergéniques répétées d'entérobactéries.

F6PPK : fructose-6-phosphate-phospho-kétolase

HPLC : chromatographie liquide haute performance

MUG : 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucuronide

ONPG : o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside

PCR : réaction en chaîne de polymérase

pH : potentiel hydrogène

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

TBE : tampon Tris-Borate-EDTA

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

INTRODUCTION

La qualité microbiologique de l'eau des rivières ou souterraine, sources d'eau potable, est affectée par l'introduction de microorganismes via les fèces suite à des déversements d'eaux usées non traitées. Même si l'eau est traitée, il est possible que des microorganismes pathogènes survivent. Grâce aux progrès rapides réalisés par la recherche microbiologique et biotechnologique, diverses méthodes ont été développées pour détecter les microorganismes pathogènes et déterminer leurs sources. Certaines ont été mises au point et d'autres sont également à l'étude. La plupart des méthodes utilisées détectent la présence de microorganismes indicateurs tels les coliformes thermotolérants pour déterminer le degré de contamination fécale dans l'eau. Ces méthodes ne permettent pas toutefois de distinguer si la source de la contamination est d'origine humaine ou animale.

Une des façons de protéger la qualité d'eau serait donc de trouver les outils nécessaires et les méthodes efficaces pour prévoir et détecter les sources de contamination afin, de les traiter. Le but de ce projet de recherche débuté en 2005 (Martellini *et al.*, 2005) était d'optimiser une nouvelle méthode moléculaire capable d'identifier les sources de pollution fécale humaine et animale dans l'eau. Cette méthode est basée sur la détection de l'ADN mitochondrial de chacune des espèces suivantes : l'humain, le mouton, le bœuf, le porc et le poulet. Plus spécifiquement, les objectifs étaient de concevoir des amorces spécifiques pour chaque espèce pour le PCR et le PCR interne, de déterminer leur spécificité, d'appliquer une nouvelle méthode d'extraction rapide, d'évaluer la sensibilité du PCR, de concevoir des amorces universelles communes aux cinq espèces, d'élaborer des oligonucléotides spécifiques à chaque espèce pour la technique hybridation ADN-ADN (dot blot), de viser toutes les cinq espèces en même temps et de détecter les marqueurs dans des échantillons d'eau.

Pour atteindre ces objectifs, différentes 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 l'ADN extrait de tissus animaux. Puis, il a fallu simplifier le protocole d'échantillonnage en passant par une étape de filtration suivie d'une extraction rapide de l'ADN total par broyage avec des billes de verre. Le protocole

d'amplification par PCR et PCR interne a dû être élaboré. Ensuite, les amorces spécifiques ont dû être testées avec l'ADN extrait d'eaux usées provenant de certaines stations d'épuration (Favreville et Auteuil) et d'eaux de rivières (l'Assomption et des Mille-Îles). La détection des marqueurs, les tests de sensibilité avec les amorces spécifiques et l'évaluation de la durée de vie des marqueurs ont été faits.

Ensuite, il a fallu développer des amorces pour cibler les cinq espèces en même temps. Puis, il a fallu tester ces amorces avec des ADNs spécifiques à chaque espèce avant de les tester sur les échantillons d'eaux usées et d'eaux de rivières. La discrimination des espèces a dû être faite par expérience de dot blot. Pour ce faire, des oligonucléotides spécifiques à chaque espèce ont dû être élaborés avant d'être fixés sur des membranes de nylon. Le produit PCR contenant les amorces universelles (préalablement marqué) a servi de sonde pour une hybridation avec ces oligonucléotides. Par la suite, il a fallu faire des hybridations avec les sondes comprenant l'ADN spécifique de chaque espèce pour investiguer la présence des réactions croisées. Finalement, ces deux méthodes ont servi à détecter les différentes sources de contamination fécale dans les échantillons d'eau provenant d'eaux usées et d'eau de rivière.

CHAPITRE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Différentes sources de contamination de l'eau

Il est important d'identifier la source de la contamination de l'eau et d'apporter les correctifs appropriés. La source de contamination peut être «locale» où la provenance des contaminants est connue; par exemple, les contaminations peuvent être causées par l'eau usée sortant des stations d'épuration, les débordements d'égouts lors d'orages, les exploitations des mines souterraines, les milieux d'enfouissement des déchets, etc (Ritter *et al.*, 2002). Dans la plupart des cas, la contamination de l'eau peut être «diffuse» ou non localisée. Dans ce cas il est beaucoup plus difficile de définir l'origine de la contamination. Les épandage de fumier ou autres activités générant de la contamination fécale, les infiltrations de surfaces (pesticides, engrais chimiques et organiques, etc), les installations septiques défectueuses, les déjections des animaux sauvages, les rejets illégaux des déchets et les débordements d'eau jumelés aux déversements et aux dérivations aux stations d'épuration peuvent altérer grandement la qualité des eaux de surfaces (Simpson *et al.*, 2002).

1.2 Indicateurs d'une contamination fécale

La détermination des sources de contamination fécale dans les eaux des rivières, dans les eaux de baignade, dans l'eau du robinet est particulièrement importante en santé publique. Certains types de microorganismes pathogènes sont une menace à la qualité de l'eau potable et sont responsables de maladies d'origine hydrique. La mise au point de méthodes scientifiques afin de déterminer les sources de contamination fécale dans les écosystèmes aquatiques est donc nécessaire. Bien qu'il n'existe pas encore une méthode de détection idéale, plusieurs études essaient d'améliorer leurs protocoles. Certaines méthodes se basent sur la détection d'indicateurs de contamination fécale (Stewart *et al.*, 2007). Il s'agit d'organismes dont la présence traduit l'état de l'eau (OCED, 2003; Bitton, 1999).

L'indicateur idéal devrait avoir plusieurs caractéristiques : il devrait faire partie de la microflore intestinale des animaux ; il devrait être présent en même temps que les bactéries pathogènes et être plus nombreux qu'elles; il ne devrait pas présenter un danger pour l'être humain; il devrait être au moins aussi résistant aux stress environnementaux et à la

désinfection que les bactéries pathogènes; il ne devrait pas pouvoir se multiplier dans l'environnement ; il devrait être facilement et rapidement détectable par des méthodes peu coûteuses; et finalement, il devrait être facile à isoler, identifier et énumérer (Bitton, 1999).

1.2.1 Les coliformes totaux

De nombreux indicateurs ont été développés au cours des années et les coliformes totaux sont les premiers à avoir été utilisés. Les coliformes totaux qui appartiennent à la famille des Entérobactériacées sont des bactéries bacilliformes, non sporulantes, Gram négatif, aérobies et anaérobies facultatives. Les coliformes totaux contiennent diverses espèces des genres *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, et *Citrobacter* (Stewart *et al.*, 2007). Des membres de ces groupes sont naturellement présents dans l'environnement, tandis que d'autres s'y retrouvent suite à une contamination fécale. Les coliformes totaux sont capables de fermenter le lactose dans les 48 heures à 35°C avec production du gaz. Ils sont capables de former des colonies rouges à reflets métalliques (or) dans les 24 heures à 35 °C dans un milieu de type Endo contenant du lactose (Stewart *et al.*, 2007).

Différentes méthodes sont utilisées pour détecter ces coliformes totaux: la méthode présence-absence, la filtration sur membrane et la fermentation multitube. Ces trois méthodes reposent sur la culture. Certains milieux de culture contiennent des substrats pour les enzymes bactériennes, comme l'enzyme β -galactosidase, destinés à détecter et à confirmer spécifiquement la présence de coliformes totaux en une seule étape (Hurst *et al.*, 2007; Ley *et al.*, 1988). À noter que toutes les bactéries qui contiennent l'enzyme β -galactosidase appartiennent au groupe des coliformes totaux. L'activité de la β -galactosidase hydrolyse un substrat chromogène, par exemple l'*ortho*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), pour produire de l'*ortho*-nitrophénol, qui fait virer la couleur du milieu au jaune indiquant alors donc la présence de coliformes totaux (Bitton, 1999 ; Edberg *et al.*, 1988 ; Edberg *et al.*, 1989). D'autres milieux indicateurs de la présence de coliformes totaux utilisent le bouillon de lauryl tryptose et les milieux M-Endo ou LES Endo. L'utilisation de tels milieux à base de lactose pour le test présence-absence ou la méthode fermentation multitube, permet la formation d'acide ou de gaz après 24 heures à 35 °C lorsque le résultat est positif (Bitton, 1999).

La technique de filtration sur membrane est une méthode quantitative fondée sur des membranes filtrantes dont les pores peuvent retenir les microorganismes cibles (Clesceri *et al.*, 1998). Le filtre contenant ces microorganismes sera transféré sur un milieu de croissance pour l'identification et la quantification.

Dans la méthode de fermentation multitube, l'eau à analyser est diluée avant d'être distribuée et incubée dans des tubes contenant les milieux appropriés (en présence de substrats pour l'enzyme β -galactosidase). La présence de coliformes totaux est confirmée au moyen d'un bouillon lactosé bilié au vert brillant et la formation de gaz dans les 48 heures à une température de 35°C. Les résultats sont exprimés sous forme de nombre le plus probable (NPP). Pour la détermination du NPP, des plaques à cupules contenant un milieu spécifique et les substrats pour l'enzyme β -galactosidase sont utilisées. L'eau sera ajoutée à la plaque et les cupules qui contiennent des coliformes totaux subiront un changement de couleur spécifique. Le nombre de cupules positives est alors utilisé pour calculer le NPP (Bitton, 1999 ; Prescott, Harley et Klein, 1995). La technique de fermentation multitube est plus difficile à appliquer et produit des résultats moins rapidement que la technique de filtration sur membrane. Elle est considérée comme une méthode comparative et est plus utilisée lorsque les conditions ne permettent pas d'utiliser la technique filtration sur membrane, par exemple, en présence d'eau trouble, colorée ou très contaminée (Clesceri *et al.*, 1998).

Les coliformes fécaux ou thermotolérants sont de bons indicateurs de contamination fécale. Ce sont tous les coliformes pouvant fermenter le lactose à 44.5°C (Bitton, 1999). *E. coli* peut à elle seule constituer un indicateur de pollution fécale (Stewart *et al.*, 2007). *E. coli* fait partie des bactéries de la flore intestinale de l'être humain et des animaux. Certaines de ces souches sont pathogènes. Dans tous les cas, leur présence dans l'eau témoigne d'une contamination fécale, et donc d'un risque de propagation de germes transmissibles par voie orale-fécale. (Stewart *et al.*, 2007).

Plusieurs méthodes sont aussi utilisées pour détecter à la fois les coliformes totaux et *E. coli* dans l'eau contaminée. La méthode Colilert est la plus utilisée. L'échantillon à analyser sera mélangé avec le milieu de culture Colilert pour ensuite être incubé pendant 24 heures à 35°C. Le milieu de culture Colilert contient de l'ONPG (ortho-nitrophényl- β -D-galactopyranoside) et du MUG (4-méthylumbélliféryl- β -D-glucoronide). Lorsque des coliformes totaux sont présents dans l'échantillon, l'ONPG est utilisé par l'enzyme β -D-

galactosidase et la couleur jaune apparaît. Lorsque *E. coli* est présent dans l'échantillon, le MUG est utilisé par l'enzyme β -D-glucuronidase et une fluorescence bleue apparaît lorsque le milieu est mis sous U.V. Certaines bactéries qui ne sont pas des coliformes totaux ou *E. coli* peuvent aussi utiliser l'ONPG ou le MUG, mais le milieu de culture Colilert contient des inhibiteurs qui empêchent leur croissance. Il est à noter que cette méthode sert à détecter le *E. coli* mais ne permet pas de détecter et d'identifier les souches pathogènes de *E. coli*, notamment la bactérie *E. coli* O157:H7 où la β -D-glucuronidase est absente (Bitton, 1999; Clesceri *et al.*, 1998; Harwood, 2007).

1.2.2 Les bactéries *Bifidobacterium*

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* sont aussi des indicateurs prometteurs de contamination fécale. Ce genre est prédominant dans la flore intestinale de la plupart des espèces animales ainsi que chez l'humain (Biavati *et al.*, 2000). *Bifidobacterium* présente certains avantages sur *E. coli*: il est présent en plus grande proportion qu'*E. coli* dans les matières fécales et les espèces dominantes de *Bifidobacterium* sont différentes selon l'hôte colonisé. Par exemple, *B. pseudolongum* subsp. *globosum* et *B. boum* se retrouvent dans les matières fécales des ruminants (Klein *et al.*, 1998) tandis que *B. adolescentis*, *B. dentium* et *B. longum* se retrouvent dans le tractus digestif de l'humain (Mangin *et al.*, 1999). L'énumération est réalisée en faisant des dilutions successives. Des milieux d'enrichissement en acide propionique sont parfois utilisés. L'incubation en milieu anaérobique varie entre 18 et 72 heures, et la température de croissance idéale se situe entre 37°C et 39°C. L'ajout de substances limitantes pour la croissance d'autres bactéries telles les antibiotiques ou les acides aux milieux de culture permet de réaliser des milieux sélectifs. Le test de confirmation le plus efficace est le test de la fructose-6-phosphate-phospho-kétolase (F6PPK). Cette enzyme est absente chez les bactéries Gram positives anaérobies et constitue donc un bon élément de différenciation étant donné que toutes les espèces du genre *Bifidobacterium* possèdent l'enzyme. La formation d'acétyl-P à partir de fructose-6-P est visualisée par la formation d'une couleur violette (Gavini *et al.*, 1996).

D'autres méthodes moléculaires ont permis aussi de détecter les bifidobactéries telle que la technique de PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) développée sur les gènes de l'ARN 16S ribosomal. Après l'amplification d'un fragment d'environ 1050 pb à

l'aide d'amorces spécifiques du genre *Bifidobacterium*, le produit de PCR est digéré par chaque enzyme de restriction (*AluI* et *TaqI*) pour donner l'apparition de différents profils. Cette méthode permet de différencier facilement les espèces ou groupes d'espèces d'origine humaine de celles ou ceux d'origine animale avec les profils de deux enzymes de restriction (Delcenserie *et al.*, 2004). L'autre méthode moléculaire se base sur l'amplification PCR ciblant cette fois le gène *hsp60* (Delcenserie *et al.*, 2005). Cette méthode a été développée à l'aide d'amorces dégénérées spécifiques du genre *Bifidobacterium*. Le genre *Bifidobacterium* est identifié par l'amplification d'un fragment de 217 pb du gène *hsp60*.

1.2.3 Les virus bactériens et entériques

Les bactériophages d'*E. coli* (coliphages) et ceux des *Bacteroides spp.* sont utilisés dans la détection de la contamination fécale en raison de leur similarité avec les *Enterovirus* humains et de la facilité de leur détection dans l'eau. Les bactériophages à ARN (F+) infectent *E. coli* et les bactéries apparentées, par le biais des pili F ou sexuelles. Ces bactériophages sont retrouvés dans les matières fécales humaines et se multiplient rarement dans l'environnement (Hot *et al.*, 2003). Il est possible de les détecter directement mais étant donné qu'ils sont souvent en petits nombres une étape de concentration est requise. Le dénombrement des phages s'effectue traditionnellement par les méthodes de simples ou de doubles couches d'agar et par celle du nombre le plus probable (Bitton, 1999; Clesceri *et al.*, 1998).

D'autres méthodes moléculaires de détection des virus entériques dans l'eau comme celle de la transcriptase inverse suivie de PCR (RT-PCR) et la culture cellulaire intégrée (ICC)-PCR sont utilisées. Ces méthodes combinent la culture cellulaire et la détection moléculaire d'acide nucléique de génome viral. La détection d'ARNm viral par la méthode RT-PCR dans des cultures de cellules inoculées est une méthode très sensible, spécifique et rapide de détection des virus (Ko *et al.*, 2003; Payment, 2001).

1.2.4 Parasites

L'analyse moléculaire des génotypes des parasites présents dans l'eau peut être utile pour détecter des sources de contamination fécale. À titre d'exemple, une étude faite par Ruecker *et al.* (2007) sur la rivière South Nation (Ontario) et la rivière Oldman (Alberta) a

montré une contamination fécale liée à diverses espèces sauvages telles que le cerf, le renard, l'oiseau et la mouffette. Ces résultats reposent sur la détection d'oocystes de *Cryptosporidium* présentant des similitudes de séquences d'ADN avec le génotype du *Cryptosporidium* du renard, du génotype du *Cryptosporidium* du cerf, du *Cryptosporidium baileyi* (oiseau), du *Cryptosporidium* de la mouffette, du *Cryptosporidium andersoni* (bovin) et du génotype bovin du *Cryptosporidium parvum* (bovins, ou humains).

1.2.5 Autres indicateurs

Des substances chimiques ont été utilisés pour détecter une contamination fécale. Les stérols fécaux tel que 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 (Bitton, 1999). Les indicateurs comme les stérols fécaux contenant du Cholestane et présents dans la matière fécale sont influencés par plusieurs facteurs tel que, le régime alimentaire des animaux (herbivores, omnivore, carnivore), la biosynthèse de stérols chez les diverses espèces et la biohydrogénation des stérols sous l'action des bactéries anaérobies dans le tractus digestif des différentes espèces (Ha et Stenstrom, 2000 ; Scott *et al.*, 2002 ; Glassmeyer *et al.*, 2005).

Chez le porc, l'humain, et le chat, l'hydrogénation bactérienne du cholestérol aboutit au coprostanol. Deux stéréo-isomères du coprostanol peuvent se retrouver dans les excréments : le cholestanol et l'épicoprostanol. À noter que le cholestérol ne peut pas être considéré comme marqueur spécifique des déjections animales car il est présent chez les bactéries, les algues et les zooplanctons. Les stérols d'herbivores tels que les moutons et les vaches comprennent plus de 24-ethylcoprostanol (C29-stanol), de sitostérol, de sitostanol (C29-stérol et stanol), de campestanol (C29-stanol), de cholestérol (C27-stérol) et une très faible quantité de coprostanol. Par contre, les omnivores tels que les êtres humains et les cochons sont caractérisés par la présence de coprostanol formé à partir du cholestérol. Les concentrations en coprostanol sont 4 à 10 fois plus importantes dans les fèces humaines que dans les lisiers de porc. Le rapport du coprostanol sur le cholestérol est généralement supérieur à 10 chez l'être humain, alors qu'il varie entre 2 et 5 chez le porc (Elhmmali *et al.*, 2002). En outre, les stérols dans le lisier de porc ont plus de C29-stérols et stanols, beaucoup plus élevé que dans les fèces humaines. Ces différences dans les rapports permettent de lier la

contamination fécale à l'espèce origine (Ha et Stenstrom, 2000; Scott *et al.*, 2002 ; Glassmeyer *et al.*, 2005).

D'autres méthodes envisagées pour s'assurer que la contamination fécale est d'origine humaine, sont basées sur la détection de la caféine dans l'eau. 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).

1.3 Méthodes de détection de contamination fécale

Grâce aux progrès rapides réalisés ces dernières années par la recherche biotechnologique, diverses méthodes ont été développées. Certaines ont été mises au point et d'autres sont encore à l'étude. Les méthodes sont divisées en deux grands groupes : Celles qui reposent sur une banque de matériel microbien de référence et celles qui sont indépendantes de telle banque de matériel (Can *et al.*, 2005).

1.3.1 Méthodes de détection avec banque de matériel microbien

Ces méthodes consistent à choisir un microorganisme fécal indicateur puis à collecter des isolats à partir de l'environnement étudié comme par exemple un bassin versant. Ainsi, l'échantillonnage comprendra des isolats provenant de diverses sources comme les fèces animales, les eaux usées et les fosses septiques. Une banque d'isolats références est ainsi constituée comprenant les caractéristiques des isolats bactériens provenant de sources connues de contamination fécale. Le typage de ces isolats est ensuite fait telles leurs empreintes géniques (voir section 1.4) ou physiologiques. Si dans le suivi d'un environnement, des isolats de notre microorganisme indicateur sont détectés, ses empreintes vont être comparées à celles présentes dans la banque de références afin de déduire la source des isolats trouvés dans cet environnement. Les indicateurs fécaux les plus utilisés sont les *E. coli* et les *Enterococcus*. Ces bactéries colonisent le tube digestif et sont faciles à isoler dans les laboratoires (Edge et Schaefer, 2006; Wheeler *et al.*, 2002, 2003).

Il existe une panoplie de méthodes qui ciblent des marqueurs géniques spécifiques. Pour distinguer une espèce bactérienne d'une autre, il y a l'amplification PCR des gènes 16S de l'ARN ribosomal et leur séquençage. Toutefois, dans le cas de la différenciation de différents isolats d'une même espèce, la séquence des gènes 16S ribosomaux n'est pas assez

discriminatoire. Scott *et al.* (2002) a décrit trois types marqueurs qui peuvent être amplifiés par PCR. Ces marqueurs comprennent les séquences palindromiques extragéniques répétées (REP), les séquences consensus intergéniques répétées d'endobactéries (ERIC) et des éléments extragéniques répétés (BOX-PCR). Il a été découvert que ces séquences répétées étaient distribuées différemment dans le chromosome bactérien des isolats d'une même espèce. L'amplification PCR de ces éléments génère donc un profil unique à chaque isolat.

Une autre méthode est l'électrophorèse en champ pulsé (ECP) ou «Pulsed Field Gel Electrophoresis » (PFGE). Une technique fondée sur l'analyse du chromosome bactérien qui permet d'associer à chaque isolat une empreinte génétique caractéristique, appelée dans ce cas «pulsotype ». Ainsi, l'ADN total des isolats est soumis à l'action d'une endonucléase de restriction reconnaissant des sites de coupure rares générant un nombre restreint de fragments d'ADN de très grande taille. Après digestion par une endonucléase de l'ADN, les fragments résultant sont séparés par électrophorèse basée sur l'application d'un champ électrique alterné multidirectionnel (champ pulsé). Les fragments séparés donne une empreinte génétique (pulsotype) caractéristique de chaque isolat analysé (Flint *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2002).

Dans le cas des empreintes physiologiques, celles-ci sont fondées sur des phénotypes spécifiques pour comparer les isolats, comme la résistance aux antibiotiques (Hagedorn *et al.*, 2003). Les approches basées sur la résistance aux antibiotiques (Harwood *et al.*, 2000 ; Edge et Hill, 2005) trouvent que les bactéries colonisant le tube digestif de l'humain et des animaux domestiques possèdent différents profils de résistance vu qu'elles sont exposées aux traitements médicaux et vétérinaires, tandis que les bactéries entériques des animaux sauvages ne sont pas exposées aux antibiotiques (Edge et Schaefer, 2006).

1.3.2 Méthodes de détection sans banque de matériel microbien

Les méthodes sans banque de matériel microbien de références sont basées sur la détection d'indicateurs spécifiques aux espèces indiquant que la contamination fécale de l'eau provient d'une espèce humaine ou animale spécifique. La plupart de ces méthodes utilisent le PCR pour détecter des marqueurs géniques spécifiques. Ainsi des échantillons sont pris de l'environnement à l'étude, l'ADN total en est extrait et une séquence d'ADN spécifique au microorganisme indicateur est amplifiée par PCR. La culture bactérienne n'est donc pas nécessaire, mais elle peut l'être dans certains cas pour augmenter le nombre de

microorganismes porteurs d'un gène d'indicateur spécifique (Harwood, 2007). Par exemple, Scott *et al.* (2005) a proposé le gène qui code pour une protéine de surface (*esp*), un facteur de virulence putatif, chez *Enterococcus faecium* comme indicateur spécifique de contamination humaine. Bernhard et Field (2000) quant à eux ont ciblé des séquences d'ADN 16S ribosomiaux des *Bacteroides* comme indicateurs d'une contamination fécale.

1.3.3 Puces à ADN

Une méthode prometteuse dans le suivi de marqueurs géniques spécifiques est la puce à ADN. La puce est constituée d'un support miniaturisé sur lequel sont concentrés à haute densité de plusieurs sondes ADN (Cho *et al.*, 2002). Ces sondes peuvent représenter des séquences nucléotidiques spécifiques à des gènes codant pour des toxines, de l'ARN 16S ribosomal, de protéine impliquée dans la résistance à des antibiotiques, des facteurs de virulence, etc... (Garrido *et al.*, 2006; Hamelin *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2001). Cette technique a été utilisée pour détecter des microorganismes pathogènes dans l'eau contaminée, dans les aliments et même dans le domaine médical (Sadowsky *et al.*, 2007). L'ADN total de l'environnement étudié ou des isolats est extrait et marqué avec un marqueur fluorescent. Cette ADN marqué est ensuite hybridé à la puce. Si une ou plusieurs sondes sur la puce sont révélées, cela signifie que l'environnement contient un microorganisme contenant ce ou ces gènes, ou que l'isolat contient ce ou ces gènes. L'avantage de la puce est sa rapidité, mais surtout le suivi de plusieurs marqueurs géniques à la fois, ce qui accroît la spécificité de la méthode de suivi.

1.4 L'ADN mitochondrial, un indicateur de choix

Pour identifier la source de contamination fécale, la majorité des méthodes cherchent à isoler les microorganismes ou leurs ADNs dans l'eau ou travaillent à lier certaines souches de bactéries ou certains sérotypes de virus à un animal en particulier. Cependant, il est difficile de différencier le type d'animal responsable d'une contamination fécale à partir des microorganismes, certains pouvant se retrouver dans les fèces de toutes les espèces animales (Khatib, 2002). Selon Isolauri *et al.* (2002), la flore intestinale normale est une collection de microorganismes complexes en équilibre qui habitent naturellement le tractus gastro-intestinal. La microflore du tractus gastro-intestinal a été estimée à près de 10^{13} à 10^{14} cellules

microbiennes représentant 400 à 500 espèces et sous espèces. Cette microflore représente environ 10 fois le nombre total de cellules du corps humain (Moore et Holdeman, 1974). Les fèces contiennent aussi des résidus d'aliments digérés ou non digérés ainsi que des cellules épithéliales détachées des parois du tractus gastro-intestinal (Iyengar *et al.*, 1991). Ces cellules épithéliales peuvent être isolées des fèces ainsi que leur ADN. L'ADN des cellules eucaryotes constitue un marqueur génique intéressant pour retracer directement la source de la contamination fécale. L'ADN mitochondrial a été sélectionné dans notre étude pour servir de cible au lieu de l'ADN génomique. Ce choix s'est fait en fonction des données suivantes.

L'ADN mitochondrial est présent en plusieurs copies dans la cellule (Walker *et al.*, 2004). Cela est très avantageux surtout si les échantillons d'eaux contiennent peu de cellules. L'ADN mitochondrial est moins sensible à la dégradation que l'ADN génomique et a une durée de vie plus longue à cause de sa petite taille, de sa structure circulaire et de sa protection par la mitochondrie (Walker *et al.*, 2004). L'ADN mitochondrial a évolué plus rapidement que l'ADN génomique, donc sa séquence est assez variable pour préparer des amorces spécifiques à l'espèce (Lahiff *et al.*, 2001).

Du laboratoire du Dr Villemur, Martellini *et al.* (2005) ont été les premiers à utiliser des séquences spécifiques l'ADN mitochondrial comme marqueurs géniques pour le suivi de la source de contamination fécale dans l'eau. Ceux-ci ont sélectionné des amorces spécifiques simples et internes ciblant l'ADN mitochondrial de 4 espèces: l'humain, le mouton, le bœuf et le porc. Un protocole d'amplification par PCR simple et PCR interne ainsi que par PCR multiplex a été élaboré pour cibler les ADNs mitochondriaux de ces 4 espèces. Au moins une des 4 espèces a été détectée dans la plupart des échantillons d'eaux usées provenant de la station d'épuration de Fabreville, d'eaux provenant de deux fermes, de lisier de porc, et d'eaux provenant de la rivière l'Assomption et de la rivière des Mille-Îles. À noter que, la concentration de la matière en suspension présente dans les eaux usées et dans les eaux des rivières a été réalisée par centrifugation, et l'extraction d'ADN a été faite au phénol/chloroforme. Martellini *et al.* (2005) ont aussi démontré que 10^3 à 10^4 cellules humaines par litre d'eaux usées peuvent être détectées en utilisant le protocole de PCR multiplex. Mon projet de maîtrise s'inscrivait dans le développement plus poussé de cette nouvelle approche du suivi de la contamination fécale et de sa source.

CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES

2.1 Échantillons

Les échantillons de tissus (foie de mouton, de bœuf et de porc) ont été fournis par la faculté de médecine vétérinaire à St-Hyacinthe. Les cellules humaines HRT-18 (cellules cancéreuses du côlon) ainsi que les cellules de souris dBT (cellules tumorales du cerveau) ont été fournies du laboratoire du Dr Pierre Talbot à l'INRS- Institut Armand-Frappier. Les trachées de poulet ont été obtenues du laboratoire du Dr Charles Dozois aussi à l'INRS- Institut Armand-Frappier.

Des échantillons d'eaux ont été prélevés directement des rivières et de stations d'épuration (Québec, Canada). Un échantillon a été prélevé de la station de filtration de Repentigny de la rivière l'Assomption (7 juillet 2006) ainsi que deux autres échantillons (25 juillet 2006) au nord et au sud de la rivière l'Assomption à la hauteur de Repentigny. Un échantillon a été prélevé de la rivière des Mille-Îles (23 août 2006) au niveau de Rosemère (parc Mille-Îles). Deux autres échantillons provenant directement de l'eau de rivière des Mille-Îles (19 avril et 7 juin 2006) ont été pris de la station de filtration de Sainte Rose. Des échantillons d'eaux usées ont été prélevés de la station d'épuration de Fabreville, Laval (9, 16 mai et 7 juin 2006) et de la station de d'épuration d'Auteuil, Laval (19 avril et 7 juin 2006).

2.2 Concentration de la matière en suspension

2.2.1 Filtration

Afin de concentrer la matière en suspension présente dans l'eau des rivières ou dans les eaux usées, 150 à 300 ml d'eau ont été filtrés sous vide tout en utilisant une membrane filtrante en nylon de porosité 0,22 µm (Millipore). Une fois la matière retenue par le filtre, ce dernier a été enroulé et introduit dans un tube fourni par Qbiogene (FastDNA[®] SPIN Kit (Qbiogene, Inc. Solon, Ohio, USA)) contenant une sphère en céramique et des billes de verre pour extraire l'ADN.

2.2.2 Centrifugation

De 1 à 1.5 litres d'eau de rivière ou d'eaux usées ont été centrifugés 15 minutes à 7000 g dans une centrifugeuse Beckmann Avanti TM J-25 avec le rotor JLA-10.5 pour concentrer la matière en suspension présente dans les échantillons. L'ADN a été extrait des culots en utilisant la méthode de FastDNA[®] SPIN Kit (Qbiogene).

2.3 Extraction d'ADN

La méthode utilisant le FastDNA[®] SPIN Kit (Qbiogene) s'est révélée la plus efficace pour extraire l'ADN total que se soit directement des tissus d'animaux ou à partir de la matière retenue sur la membrane filtrante 0,22 µm.

L'extraction d'ADN à partir d'organes provenant d'animaux s'est faite de la manière suivante : le morceau de foie (environ 0.30 g) de mouton, de bœuf, de porc et de poulet a été introduit dans un tube contenant une sphère en céramique avec des billes de verre. Un procédé d'homogénéisation (FastPrep) avec du tampon de lyse (CLS-TC ou Cell Lysis Solution) a été employé pour extraire l'ADN selon le protocole fourni par Qbiogene. Après centrifugation, le surnageant a été incubé à la température de la pièce avec une solution dénaturante à base de thiocyanate de guanidine (Binding Matrix). Le culot obtenu après la seconde centrifugation a été resuspendu avec une solution contenant du sel et de l'éthanol (SEWS-M ou Salt/Ethanol Wash Solution). Une dernière centrifugation a été faite dans un tube avec un filtre à son extrémité (SPIN filter). L'élution de l'ADN retenu dans le filtre a été faite à 55°C avec de l'eau pure (DES ou DNA Elution Solution).

L'ADN du lisier de porc brut a été aussi extrait. Un volume de 300 µl a été mis dans un tube contenant une sphère en céramique avec des billes de verre. Un procédé d'homogénéisation (FastPrep) avec du tampon de lyse (CLS-TC ou Cell Lysis Solution) a été employé pour extraire l'ADN selon le protocole fourni par Qbiogene et décrit précédemment.

L'ADN humain a été extrait à partir des cellules du côlon cancéreuses appartenant à la lignée cellulaire HRT-18 en modifiant un protocole décrit par Blin et Stafford en 1976. Le même protocole a été utilisé pour extraire l'ADN de souris à partir des cellules tumorales du cerveau. Il s'agissait de laver les cellules en culture avec une solution saline tamponnée au phosphate 1X à pH 7.2 (PBS; NaCl 137 mM, du Na₂HPO₄ 10 mM, du KCl 2.7 mM, du KH₂PO₄ 2 mM) et de les conserver à - 20°C jusqu'à utilisation. Les cellules congelées ont été

lysées pendant une heure à 37°C avec du tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1M, SDS 0.5% (p/v) et ribonucléase (RNase) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) 20 µg/ml ajouté à la dernière minute). Par la suite, les cellules ont été incubées trois heures à 50°C avec de la protéinase K à une concentration finale de 100 µg/ml. Trois extractions au phénol tamponné avec du Tris-HCl à pH 8.0 ont été effectuées. L'ADN a été précipité avec 100 µl d'acétate d'ammonium (10M) et de 2 volumes d'éthanol (100%). Finalement, l'ADN a été lavé avec de l'éthanol 70% et dissous dans l'eau à la température de la pièce.

Les échantillons d'eau de rivières et d'eaux usées ont d'abord été filtrés sous vide avec une membrane filtrante en nylon et de porosité 0,22 µm. Le filtre a été enroulé et introduit dans le tube contenant une sphère en céramique avec des billes de verre pour être extrait selon le protocole fourni par Q-Biogene et décrit précédemment.

2.4 Amplification PCR et PCR interne

Chaque réaction de polymérase en chaîne (PCR), dont le volume était 50 µl, contenait 15 µl du tampon PCR 10X (KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM et Tris-HCl 10 mM à pH 9), 1 µl des dNTPs 10 mM, 1 µl de chaque amorce (10 pmol/µl), 1 µl de Taq polymérase (TAQ- GE Healthcare, Amersham Biosciences), 1 µl de BSA (SIGMA) (20 µg/µl), 38 µl d'eau stérile et 2 µl d'ADN extrait dépendant de l'expérience. Les conditions d'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 à 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 interne (nested PCR) ont été effectuées de la même manière sauf que le mélange comprenait une paire d'amorces internes et 2 µl de produit PCR de la première réaction au lieu de l'ADN extrait.

2.5 Electrophorèse sur gel d'agarose

Dans le but de séparer les amplicons, ceux-ci ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5%. Cinq µl de produits obtenus par PCR ont été mélangés avec 2 µl de tampon de chargement (0.25% bleu de bromophénol, 0.25% xylène cyanol FF et 30% glycérol dans l'eau) avant d'être 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). Pour déterminer la taille moléculaire des bandes, il a fallu disposer dans un des puits du gel

d'électrophorèse, un marqueur constitué d'un mélange de fragments de taille connue. Ces derniers sont obtenus par digestion de l'ADN du phage Lambda digéré avec l'enzyme de restriction *SlyI*. La migration a été faite à 80 V pendant une heure environ, et le gel a été trempé dans du bromure d'éthidium (0.5 µg/ml) pendant 10 minutes et rincé à l'eau pendant 5 min sous agitation. La révélation de l'ADN a été faite sous U.V. à l'aide de l'appareil Alphamager (Alpha Innoteck).

2.6 Dot blot

2.6.1 Fixation d'oligonucléotides sur membranes

Trente oligonucléotides synthétisés par la compagnie Alpha DNA, ont été utilisés pour la discrimination des cinq espèces (humain, mouton, bœuf, porc et poulet). Tous les oligonucléotides ont été dilués avec du Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM à pH 8, pour avoir une concentration finale de 50 pmol/µl. Un chauffage à 95°C pendant 5 minutes a permis de déplier les oligonucléotides avant d'être refroidis subitement sur glace. Par la suite, 1 µl de chaque dilution d'oligonucléotides a été déposé sur une membrane en nylon (voir modèle de la membrane dans Fig. 16) puis fixés par exposition aux U.V. (par trans-illuminateur 125 mj, programme CL de BIO-RAD). Les oligonucléotides non fixés ont été éliminés en lavant la membrane 2 fois à la température de la pièce avec une solution contenant du 0.5X SSPE, 0.1% SDS. Ensuite, la membrane a été séchée avant l'étape de préhybridation.

2.6.2 Marquage d'amplicons avec la digoxigénine

Les PCR ont été faits dans les conditions habituelles tel que décrit dans le paragraphe 2.5 sauf que la solution de dNTPs a été remplacée par celle de la trousse PCR DIG Labeling Mix- (Roche, Laval, Canada). Le mélange de dNTP contenait : dATP 2 mM, dCTP 2 mM, dGTP 2 mM, dTTP 1.9 mM et DIG-11-dUTP 0.1 mM à pH 7. Les amplicons ainsi obtenus après l'amplification 35 cycles à 55°C étaient des ADN marqués au DIG sur les deux brins. Ces ADN ont servi de sondes pour des expériences d'hybridation sur les oligonucléotides fixés sur membrane.

2.6.3 *Préhybridation*

La membrane, d'environ 35 cm², a été tout d'abord humidifiée dans une solution 5X SSPE (5X SSPE, SDS 0,02 %, N-Lauryl sarcosine 0.1% et solution stock de blocage 1% (Roche)). La préhybridation s'est fait par incubation dans 15 à 20 ml de tampon d'hybridation (5X SSPE, SDS 0,02 %, N-Lauryl sarcosine 0.1%, solution stock de blocage 1% (Roche) et sonde) durant 3 heures à 55 °C dans le four d'hybridation (TEK Star Jr., BIO/CAN Scientific). Cette étape était importante pour diminuer le bruit de fond lors de l'hybridation.

2.6.4 *Hybridation*

Environ 500 ng de sonde ont été dénaturés pendant 10 min par chauffage à 100°C puis incorporés au tampon d'hybridation (10 ml par membrane). La membrane a été incubée dans ce milieu à 55°C durant la nuit. Le lendemain, la membrane a été lavée une fois pendant 5 minutes à température ambiante dans une solution 5X SSPE, 0,1% SDS et une fois pendant 30 min à 55°C dans une solution 2X SSPE, SDS 0,1 %, permettant l'élimination de l'excès de sonde non fixée. Elle a été ensuite lavée deux autres fois pendant 30 minutes à 55°C dans une solution 0,5X SSPE, SDS 0,1 % et 0,1X SSPE, SDS 0,1 % qui élimine la sonde fixée non-spécifiquement.

2.6.5 *Révélation au NBT/BCIP*

Toutes les étapes se sont déroulées à température ambiante. Les membranes ont été équilibrées pendant 1 min dans du tampon de lavage (acide malique 100 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM), puis incubées durant 30 min dans un tampon de saturation (acide malique 100 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM, solution mère de blocage 10 % (w/v)). Celles-ci ont été enfin placées dans un milieu de tampon de saturation (10 ml pour une membrane de 35 cm²) additionné d'anticorps anti-DIG-AP (Roche) (dilution 1/5000) pendant 30 min. Les membranes ont été ensuite lavées deux fois pendant 5 minutes dans le tampon de lavage, puis équilibrées 5 minutes dans la solution de révélation (Tris-HCl 100 mM pH 9,5 ; NaCl 100 mM). Elles ont été finalement placées à l'obscurité dans 10 ml de cette même solution additionnée de NBT/BCIP (Roche) (dilution 1/50), jusqu'à apparition de la coloration (en général de 2 et 16 heures).

CHAPITRE 3 : RESULTATS

Le but de ce projet était de développer une méthode moléculaire permettant la différenciation des espèces à l'origine de la contamination fécale dans l'eau. Cette méthode visait à dépister la contamination fécale en détectant l'ADN mitochondrial dans l'eau. Pour ce faire, des amorces spécifiques à l'ADN mitochondrial de l'humain, l'ovin, le bovin, le porc et le poulet ont été conçues, testées et vérifiées. Une méthode d'extraction simple et rapide d'ADN total a été développée pour des échantillons d'eau. Des PCR simples et internes ont été optimisés et effectués pour viser la présence de chaque espèce.

Des amorces universelles ont aussi été développées pour cibler les cinq espèces en même temps ainsi que des oligonucléotides spécifiques à chacune des cinq espèces ont été conçus. La discrimination des cinq espèces a été faite par expériences de dot blot. Les sections suivantes font état des résultats obtenus dans chaque cas.

3.1 Concentration de la matière en suspension dans l'eau par filtration

La filtration s'est révélée comme étant une méthode rapide (durée de 1 à 3 minutes) pour concentrer la matière en suspension dans l'eau. Plusieurs types de membrane, que ce soit en nylon ou en cellulose, et de porosités différentes (0,22 μm , 1.2 μm , 3 μm et 8 μm), ont été utilisés. Les membranes filtrantes en nylon de porosité 0,22 μm ont été choisies pour concentrer la matière en suspension dans l'eau des rivières ou dans les eaux usées. Le volume maximal d'eau chargée de matières qui a été filtré à travers les membranes de porosité 0,22 μm était de 300 ml.

Cette méthode de concentration a été comparée à celle utilisée préalablement, soit la centrifugation (Martellini *et al.*, 2005). Cette dernière consistait à centrifuger 1 à 1.5 litres d'eau pendant 15 minutes pour concentrer la matière en suspension sous forme de culots. Les deux méthodes de concentration de la matière en suspension, centrifugation et filtration, ont été réalisées en parallèle. Puis l'extraction d'ADN a été effectuée. Une comparaison de la qualité d'ADN extrait de chaque méthode a été faite par électrophorèse (Fig.1). La filtration a permis d'obtenir une qualité d'ADN comparable à celle récupérée grâce à la centrifugation.

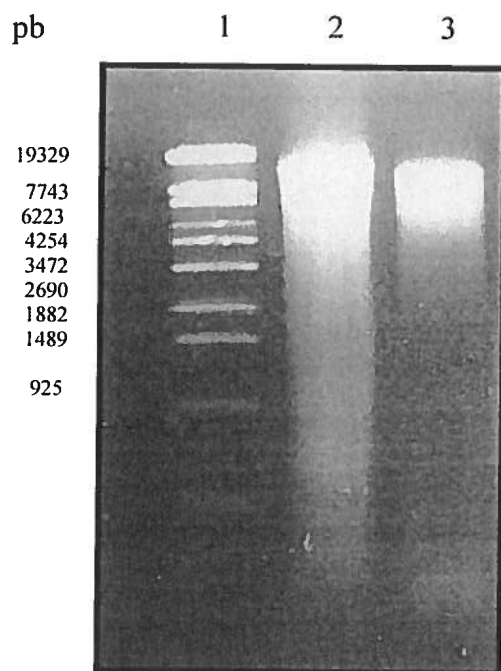


Figure 1 : Vérification de la qualité de l'ADN extrait : migration de l'ADN par électrophorèse sur un gel d'agarose 1%. Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire λ *StyI* exprimé en paires de base (pb). Puits 2 : 1.6 µg d'ADN extrait à partir des culots obtenus après centrifugation de 1.5 L d'eaux usées. Puits 3 : 1.4 µg d'ADN extrait en broyant la matière retenue sur une membrane filtrante en nylon de porosité 0,22 µm.

3.2 Élaboration des amorces spécifiques

Cette étude a ciblé l'humain, source principale de la pollution fécale, et quatre espèces animales ordinairement trouvées dans nos élevages : le mouton, le bœuf, le porc et le poulet. Pour ce faire, des séquences spécifiques d'ADN mitochondrial ont été utilisées pour développer des amorces pour des protocoles de détection par PCR. Les séquences d'ADN mitochondrial de l'humain (*Homo sapiens*), du mouton (*Ovis aries*), du bœuf (*Bos taurus*), du porc (*Sus crofa*) et du poulet (*Gallus gallus*) ont été alignées à l'aide du programme Clustal W. Les séquences présentant le plus haut degré de différences entre chaque espèce ont été sélectionnées afin de constituer les amorces spécifiques (Annexe 1).

Pour tester la spécificité de ces amorces, elles ont été comparées aux séquences nucléiques présentes dans les banques de données avec le programme BLASTN. Pour chaque espèce, des combinaisons de paires d'amorces spécifiques ont été choisies pour l'amplification PCR de séquences de longueurs différentes. Les amorces spécifiques avaient une longueur variant entre 18 et 24 pb et une concentration de 45% à 55% en GC. Le tableau 1 comporte toutes les amorces spécifiques testées.

Toutes les amorces élaborées ont été testées pour assurer leur spécificité. Chaque amplification PCR comprenant la paire d'amorces testée (Fig. 2) a été accompagnée de deux autres amplifications contrôles comprenant la même paire d'amorces, mais le premier en présence de l'ADN extrait de souris (contrôle négatif) et le second en présence d'eau pure (test de contamination). 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 total extrait de l'espèce correspondante. Seule la paire d'amorces humaine Humito 3 a amplifié l'ADN mitochondrial de souris. La figure 2 montre l'apparition d'une bande d'une faible intensité dans le puits 3 contenant la paire d'amorces Humito H3-G/H3-D en présence de l'ADN de souris.

De la même manière, les amorces internes ont été testées en utilisant 2 µl d'ADN du premier produit PCR (Fig. 3). Chaque paire d'amorces internes n'a généré qu'une seule bande ayant la longueur attendue lorsque mise en présence de 2 µl d'ADN du premier produit.

Tableau 1 : Liste des amorces pour PCR simple et PCR interne. (Nested = N).

Espèce	Amorces	Amplicon
Humain	Humito 3-G 5'-CCCAACCCGTCATCTACTCT-3'	718 pb
	Humito 3-D 5'-AGGGTGTTAGTCATGTTAGC-3'	
	Humito N 3-G 5'-CTACTCTACCATCTTTGCAGG-3'	651 pb
	Humito N 3-D 5'-CGTGGTGCTGGAGTTTAAGTTG -3'	
Mouton	Ovmito 2-G 5'- GGAACCGTTACCACATGTTAC-3'	689 pb
	Ovmito 2-D 5'- GGCTAGTAGGAAGATTAGGAGAAGA-3'	
	Ovmito N 2-G 5'-TACACTGTTACAGGCATCAGAG -3'	370 pb
	Ovmito N 2-D 5'-CGTGAAGTTAGTTAGGAGAGTA -3'	
Boeuf	Bomito 2-G 5'- CATAGCAATTGCCATAGTCC-3'	554 pb
	Bomito 2-D 5'- TTTTCGATTGTGCCGGCCGTT-3'	
	Bomito N 2-G 5'- CCCTCTACTAATTCTAGCTC -3'	401 pb
	Bomito N 2-D 5'- TTAGCACTAGGATGAGGAGA -3'	
Porc	Pomito 4-G 5'- CCCATTATCTACACTACCCTTATC-3'	723 pb
	Pomito 4-D 5'- TTAGGCTTGTGATGACGGGTAT-3'	
	Pomito N 4-G 5'- CAGTAATGTCCGGAACCATACTAG -3'	643 pb
	Pomito N 4-D 5'- TGTGGTTGCTGAGCTGTGGATT -3'	
Poulet	Ckmito 1-G 5'- ACCCTATTTGACTCCCTCAA-3'	565 pb
	Ckmito 1-D 5'- ATGTCGACCAGGGGTTTATG-3'	
	Ckmito N 1-G 5'- CCCCCACACTAACAAGCAAT -3'	381 pb
	Ckmito N 1-D 5'- GGTTGTAAGGTGGTCGTGAT -3'	

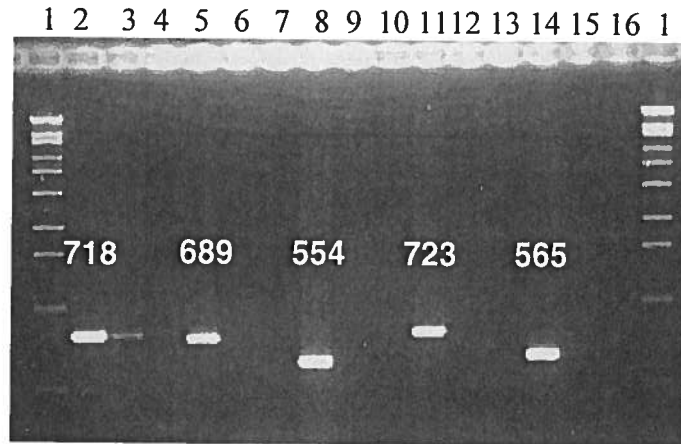


Figure 2 : Amplification PCR de l'ADN mitochondrial à partir de l'ADN total extrait des cinq espèces avec les différentes amorces spécifiques. Puits 2 : PCR simple avec l'ADN humain et les amorces Humito3. Puits 5 : PCR simple avec l'ADN ovin et les amorces Ovmito 2. Puits 8 : PCR simple avec l'ADN bovin et les amorces Bomito 2. Puits 11 : PCR simple avec l'ADN porcin et les amorces Pomito 4. Puits 14 : PCR simple avec l'ADN de poulet et les amorces Ckmito 1. Puits 3, 6, 9, 12 et 15 : les contrôles négatifs avec l'ADN de souris et les différentes amorces spécifiques. Puits 4, 7, 10, 13 et 16 : les contrôles de contamination avec l'eau pure et les différentes amorces spécifiques. Puits 1 : marqueur de poids moléculaire λ Styl. Les nombres représentent la longueur obtenue des différents produits de PCR.

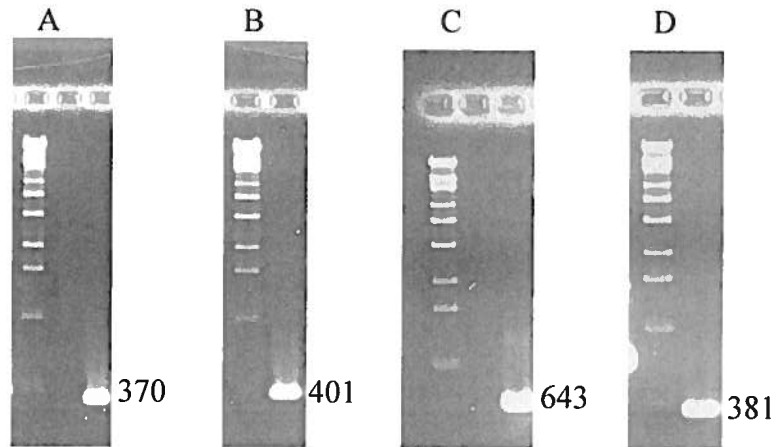


Figure 3 : Amplification PCR interne de l'ADN mitochondrial à partir de 2 μ l d'ADN du premier produit PCR avec les différentes amorces internes spécifiques. **A)** PCR interne avec les amorces Ovmito N-2. **B)** PCR interne avec les amorces Bomito N-2. **C)** PCR interne avec les amorces Pomito N- 4. **D)** PCR interne avec les amorces Ckmito N- 1. Les nombres représentent la longueur obtenue des différents produits de PCR.

3.3 Gradient PCR.

Puisque l'ADN mitochondrial de souris, considéré comme contrôle négatif, a été amplifié en présence de la paire d'amorces humaines Humito 3, une série de PCR avec un gradient de température d'hybridation a été effectuée en utilisant l'appareil du modèle Biométra[®] TGradient (Fig. 4). Cet appareil est capable de tester en une seule fois douze températures d'hybridation. Les amplifications ont été faites à des températures comprises entre 54°C et 59°C (Fig. 4, panneau A) et entre 60°C et 70°C (Fig. 4, panneau B).

Un amplicon était toujours visible lorsque les PCR ont été faites à des températures comprises entre 54°C et 59°C, et en présence des amorces Humito 3 et de l'ADN de souris. Les PCR effectuées aux températures comprises entre 59°C et 70°C n'ont pas permis de visualiser cet amplicon. Ce fut le cas aussi pour l'ADN humain qui a été utilisé. Un alignement a été fait entre les séquences d'ADN mitochondrial de l'humain et les séquences d'ADN mitochondrial de la souris (Fig. 5). La région commune pour l'amorce Humito3-G contient 5 substitutions entre les deux espèces et 11 pour l'amorce Humito-D. Il est surprenant que l'ADN mitochondrial de souris ait été amplifié. Où bien l'amplification est non spécifique, mais de même longueur, où l'ADN de souris était contaminé par l'ADN humain. Dans les deux cas, le séquençage de l'amplicon déterminerait lequel des deux hypothèses est véritable. Vu ce résultat, les deux paires d'amorces spécifiques humaines simples (Humito 1) et internes (Humito 11) élaborées par Martellini *et al.*, (2005) ont été utilisées à la place des paires d'amorces simples (Humito 3) et internes (Humito 3-N).

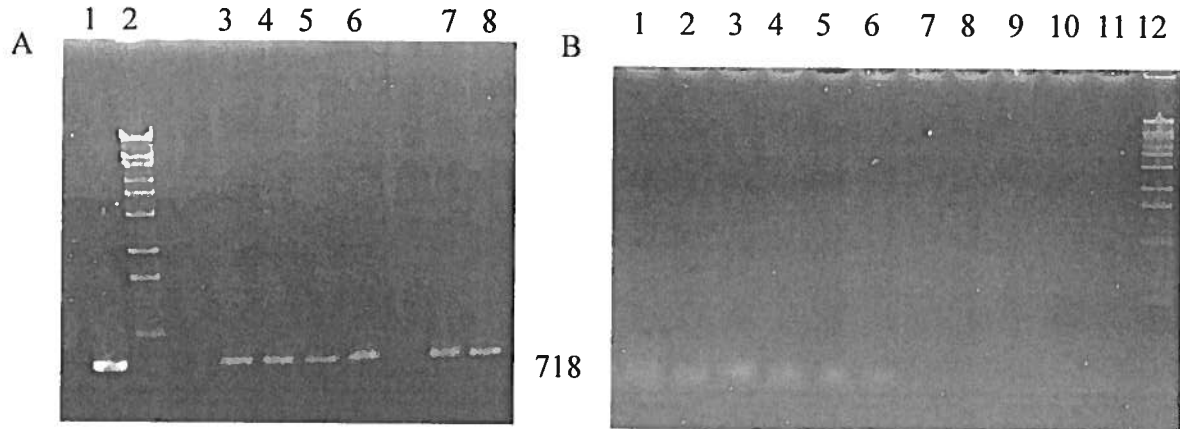


Figure 4 : Amplification PCR avec des températures d'hybridation différentes. **A)** Les amplifications ont été effectuées à 54°C (3), 55°C (4), 56°C (5), 57°C (6), 58°C (7), 59°C (8). Puits 1 : contrôle positif. Puits 2 : le marqueur de poids moléculaire λ Styl. **B)** Les amplifications ont été effectuées à 60°C (1), 61°C (2), 62°C (3), 63°C (4), 64°C (5), 64°C (6). 66°C (7), 67°C (8), 68° C (9), 69°C (10), 70°C (11). Puits 12 : le marqueur de poids moléculaire λ Styl.

Humito3-G

Humain GTT-ATACCCTTCCCGTACTAATTAATCCCTGG**CCCAACCCGTCATCTA** 4498
 Souris GTTTAAATCCTTCCCGTACTAATAAATCCTATCA**CCCTTGCCATCATCTA** 3942
 *** * * ***** ** * * ***** * ** * * *****

Humain **CTCT**ACCATCTTTGCAGGCACACTCATCACAGCGCTAAGCTCGCACTGAT 4548
 Souris CTTCACAATCTTCTTAGGTCCTGTAATCACAAATATCCAGCACCACCTAA 3992
****** * * ***** ** * * ***** * * * * *

Humain TTTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATAAACATGCTAGCTTTTATTCCAGTT 4598
 Souris TACTAATATGAGTAGGCCTGGAATTCAGCCTACTAGCAATTATCCCCATA 4042
 * * * ***** ** * * * * ***** * * * * *

Humain CTAACCAAAAAATAAACCTCGTTCCACAGAAGCTGCCATCAAGTATTT 4648
 Souris CTAATCAACAAAAAACCCACGATCAACTGAAGCAGCAACAAAATACTT 4092
 **** * * * * ***** ** * * * * ***** * * * * *

Humain CCTCACGAAGCAACCGCATCCATAATCCTTCTAATAGCTATCCTCTTCA 4698
 Souris CGTCACACAAGCAACAGCCTCAATAATATCCTCCTGGCCATCGTACTCA 4142
 * * * * ***** ** * * * * ***** * * * * * * * *

Humain ACAATATACTCTCCGACAATGAACCATAACCAATACTACCAATCAATAC 4748
 Souris ACTATAAACAACTAGGAACATGAAT-ATTTCAACAACAACAACGGT-C 4190
 ** * * * * ** * * * * ***** ** * * * * * * * * *

Humain TCATCATFAA--TAATCATAATAGCTATAGCAATAAACTAGGAATAGCC 4796
 Souris TTATCCTTAACATAACATTAATAGCCCTATCCATAAACTAGGCCCTCGCC 4240
 * * * * * * * * * * ***** ** * * * * ***** * * * *

Humain CCCTTTCACCTTCTGAGTCCCAGAGGTTACCCAGGCACCCCTCTG-ACAT 4845
 Souris CCATCCACTTCTGATTACCAGAAGTAACTCAAGGGATCCCACTGCACAT 4290
 ** * * * * ***** * * * * ***** * * * * ***** * * * * *****

Humain CCGGCCTGCTTCTTCTCACATGACAAAAACTAGCCCCATCTCAATCATA 4895
 Souris AGGACTTA-TTCTTCTTACATGACAAAAAATGCTCCCTATCAATTTA 4339
 * * * * ***** * * * * ***** * * * * * * * * *

Humain TACCAAATCTCTCCCCTACTAAACGTAAGCCTTCTCCTCACTCTCTCAAT 4945
 Souris ATTCAAATTTACCCGCTACTCAACTCTACTATCATTTTAATACTAGCAAT 4389
 ***** * * * * ***** * * * * * * * * * * *****

Humain CTTATCCATCATAGCAGGCAGTTGAGGTGGATTAAACCAGACCCAGCTAC 4995
 Souris TACTTCTATTTTCATAGGGGCATGAGGAGGACTTAACCAACACAAATAC 4439
 ** * * * * * * * * ***** * * * * ***** * * * * *****

Humain GCAAAATCTTAGCATACTCCTCAATTACCCACATAGGATGAATAATAGCA 5045
 Souris GAAAAATTTATAGCCTATTTCATCAATTGCCACATAGGATGAATATTAGCA 4489
 * * * * * * * * * * ***** * * * * ***** * * * * *****

Humain GTTCTACCGTACAACCTAACATAACCATTCTTAATTTAATCTATTTATAT 5095
 Souris ATTCTTCTTACAACCCATCCCTCACTCTACTCAACCTCATAATCTATAT 4539
 ***** * * * * ***** * * * * * * * * * * *****

Humain TATCCTAACTACTACCGCATTCTACTACTCAACTTAAACTCCAGCACCA 5145
 Souris TATTCTTACAGCCCTATATTCATAGCAGTATACTAAATAACTCTATAA 4589
 *** * * * * * * * ***** * * * * ***** * * * * * * * *

Humito3-D

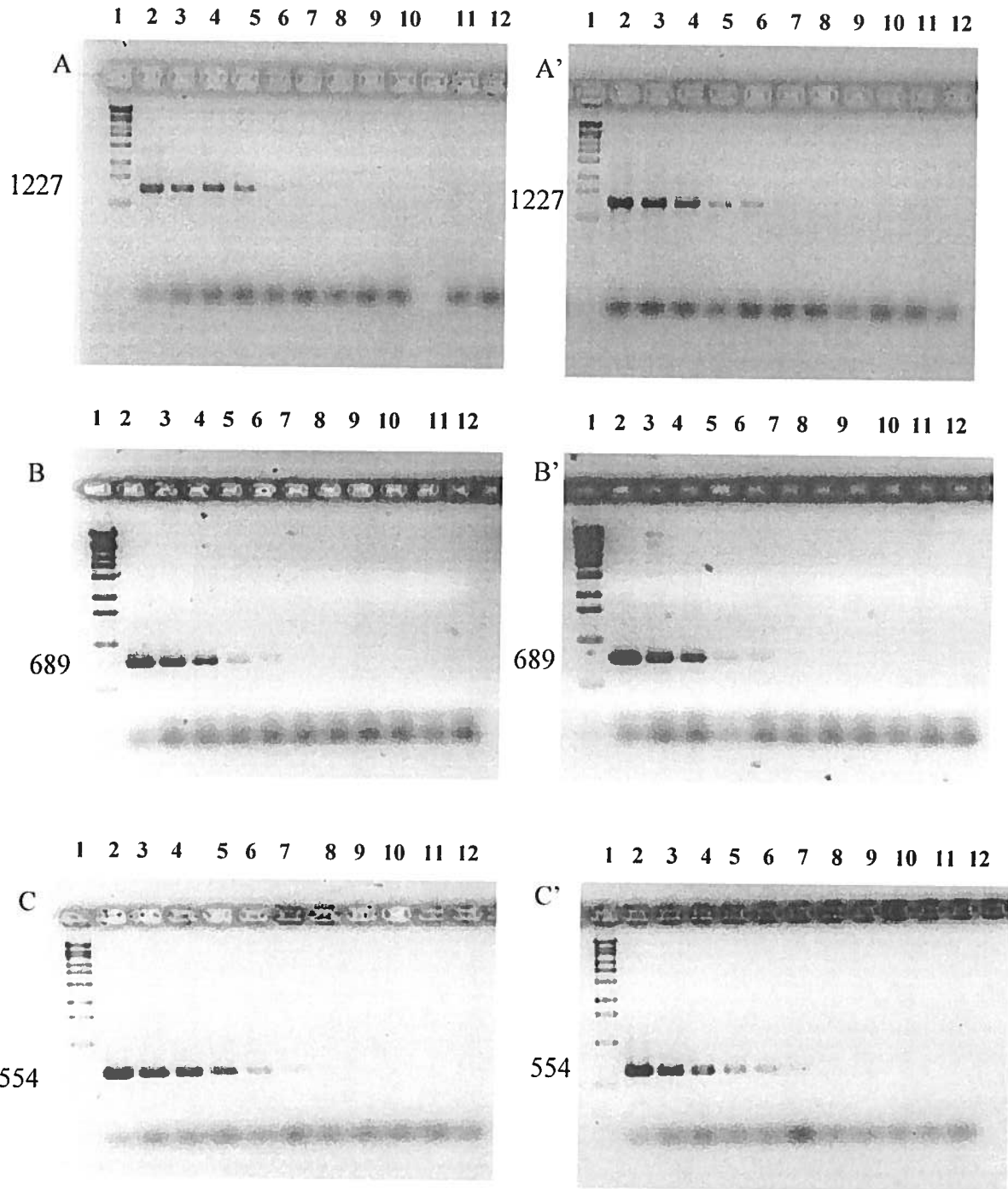
Humain CGACCCTACTACTATCTCGCACCTGAAACA**GCTAACATGACTAACACCC** 5195
 Souris CCATCAACTCAATCTCACTTCTATGAAATA**AACTCCAGCAATACTA**ACT 4639
 * * * * * * * * ***** * * * * ***** * * * * * * * *

Humain **TT**AAATCCATCCACCTCCTCTCCCTAGGAGGCCTGCCCGCTAACCGG 5245
 Souris ATAATCTCACTGATATTACTATCCCTAGGAGGCCTTCCACCCTAACAGG 4689
 **** * * * * ***** * * * * ***** * * * * ***** * * * *

Figure 5: Alignement des séquences mitochondriales de la souris et de l’humain : J01415 et AY172335 sont les numéros d’accès dans la banque de données GenBank de l’humain et de la souris respectivement. Humito3-G = amorce humaine. Humito3-D=amorce humaine gauche. * = nucléotides communs aux deux espèces.

3.4 Tests de sensibilité.

Des tests de sensibilité pour chaque paire d'amorces ont été réalisés en amplifiant différentes quantités d'ADN de l'espèce correspondante. Pour imiter les échantillons naturels (eau de rivières et eaux usées), ces expériences ont été faites une seconde fois, mais en ajoutant à chaque réaction 100 ng d'ADN bactérien. Les différentes quantités d'ADN ont été les suivantes : 10000 pg, 1000 pg, 500 pg, 100 pg, 50 pg, 10 pg, 5 pg, 0.5 pg, et 0.1 pg (Fig. 6). En comparant les produits PCR, les panneaux A, B, C, D et E (Fig. 6) montrent des amplicons jusqu'à une concentration d'ADN de 50 pg avec les amorces spécifiques à chaque espèce. Les panneaux A', B', C', D' et E' (en présence de 100 ng d'ADN bactérien) montrent aussi des amplicons jusqu'à 50 pg d'ADN de l'espèce correspondante. La présence d'ADN bactérien n'affecte donc pas les amplifications.



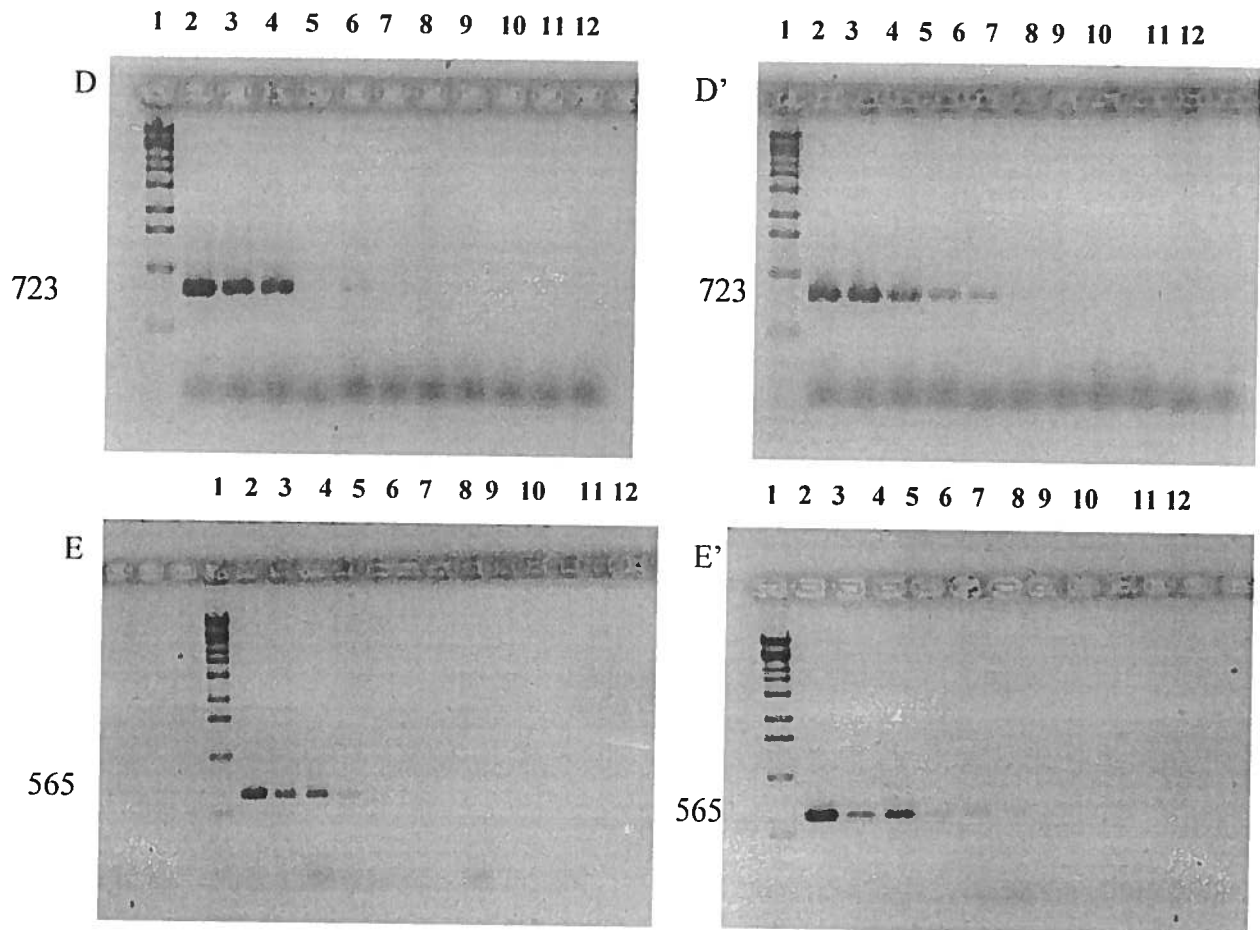


Figure 6 : Tests de sensibilité pour chaque paire d'amorces spécifiques (humain, mouton, bœuf, porc et poulet) amplifiant différentes quantités d'ADN de l'espèce correspondante. La concentration d'ADN est distribuée de la façon suivante : 10000 pg (2), 1000 pg (3), 500 pg (4), 100 pg (5), 50 pg (6), 10 pg (7), 5 pg (8), 0.5 pg (9) et 0.1 pg (10). Les panneaux A et A' : en présence de la paire d'amorces Humito 1. Les panneaux B et B' : en présence de la paire d'amorces Ovmito 2. Les panneaux C et C' : en présence de la paire d'amorces Bomito 2. Les panneaux D et D' : en présence de la paire d'amorces Pomito 4. Les panneaux E et E' : en présence de la paire d'amorces Ckmito1. Puits1: le marqueur de poids moléculaire λ Styl. Puits 11 : contrôle négatif en présence d'ADN de souris. Puits 12 : contrôle de contamination en présence d'eau. Les panneaux A, B, C, D et E : en absence d'ADN bactérien. Les panneaux A', B', C', D' et E' : en présence de 100 ng d'ADN bactérien. Les nombres correspondent à la longueur des amplicons en nucléotides.

3.5 Amplification des gènes de 16S ARN ribosomaux dans les échantillons d'eaux

Afin de tester si l'ADN extrait des eaux de rivières et des eaux usées contenait ou pas des inhibiteurs de polymérase pour les réactions PCR, les gènes de 16S ARN ribosomaux ont été amplifiés. Les matières en suspensions ont été récupérées sur une membrane filtrante de porosité 0,22 μm avant que l'ADN n'en soit extrait. Les quantités d'ADN total extraites étaient les suivantes : 27 ng et 50 ng d'ADN de la rivière des Mille-îles, au niveau de Rosemère (Laval), 300 ng et 450 ng d'ADN d'eau usée de Fabreville (Laval), et 450 ng d'ADN d'eau usée d'Auteuil (Laval). Le PCR réalisé avec les amorces ciblant les gènes 16S ARN ribosomaux (ARNr) bactériens a montré que de l'ADN bactérien était présent dans tous les échantillons, et que les réactions PCR étaient peu ou pas affectées (Fig. 7).

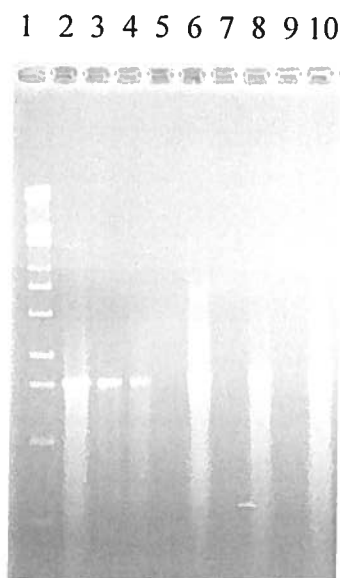


Figure 7 : PCR de l'ADN extrait d'eau de rivières et d'eau usée avec les amorces ARNr 16S bactériens. Puit 1 : le marqueur de poids moléculaire λ *StyI*. Puits 2 : le contrôle positif en présence d'ADN bactérien extrait d'un biofilm. Puits 3 et 4 : PCR avec 50 ng et 27 ng d'ADN extrait d'eau de la rivière des Mille-îles au niveau de Sainte Rose. Puits 6 : PCR avec 400 ng d'ADN extrait d'eau usée de Fabreville. Puits 8 : PCR avec 300 ng d'ADN extrait d'eau usée de Fabreville. Puits 10 : PCR avec 400 ng d'ADN extrait d'eau usée d'Auteuil. Puits 5, 7 : les contrôles négatifs en présence d'eau pure. Puits 9 : le contrôle négatif en présence d'ADN de souris.

3.6 Eau de rivières

Le but de ce projet était d'appliquer la méthode moléculaire qui visait à identifier et différencier les espèces à l'origine de la contamination fécale dans l'eau. Deux rivières ont été choisies pour appliquer cette méthode : la rivière des Mille-Îles et la rivière l'Assomption. Deux échantillons ont été pris de la rivière des Mille-îles, au niveau de Sainte Rose, Laval, (**R1** le 19 avril 2006 et **R2** le 7 juin 2006). Un autre échantillon a été prélevé de la rivière des Mille-Îles au niveau de Rosemère (**MI** le 23 août 2006). Un échantillon a aussi été prélevé de la station de filtration l'Assomption (**AS1** le 17 juillet 2006) ainsi que deux autres échantillons (**AS2-N** et **AS2-S** le 25 juillet 2006) ont été pris au nord et au sud de la rivière l'Assomption à la hauteur de Repentigny. L'ADN a été extrait des échantillons d'eau. Le tableau 2 montre les résultats obtenus suite aux amplifications PCR simples avec les amorces spécifiques simples (Humito 1, Humito 3, Ovmito 2, Bomito 2, Pomito 4 et Ckmito 1) et en présence des ADN extraits de chaque rivière et à chaque échantillonnage.

Les résultats du tableau 2 montrent qu'aucune espèce animale n'a été détectée dans l'eau de rivière de Mille-Îles au niveau de Sainte Rose suite à deux échantillonnages (R1 et R2). Par contre, dans les échantillons provenant de l'eau de rivière de l'Assomption (AS1, AS2-N et AS2-S), l'ADN mitochondrial de bœuf et de poulet a été détecté. Le troisième échantillon provenant de l'eau de rivière de Mille-Îles (MI) au niveau de Rosemère, seul l'ADN mitochondrial de l'humain et du poulet a été amplifié.

D'après les résultats obtenus avec le PCR simple, un PCR interne a ensuite été réalisé avec 2 µl du produit du premier PCR (tableau 3). Dans l'eau de la rivière des Milles-Îles au niveau de Rosemère, en plus de l'ADN mitochondrial de l'humain et du poulet, le PCR interne a permis de révéler la présence de l'ADN mitochondrial de porc, ce qui n'avait pas été observé avec le PCR simple. Pour les autres échantillons, les profils PCR simple et PCR interne étaient identiques.

Tableau 2 : Résultats obtenus à partir des amplifications faites en présence des amorces spécifiques simples et de l'ADN extrait des eaux de rivières.

	H1-G/H1-D	H3-G/H3-D	O2-G/O2-D	B2-G/B2-D	P4-G/P4-D	Ck1-G/Ck1-D
Mille-Îles (R1)	-	-	-	-	-	-
Mille-Îles (R2)	-	-	-	-	-	-
Assomption 1 (AS1)	-	-	-	+	-	+
Assomption 2 Nord (AS2-N)	-	-	-	+	-	+
Assomption 2 Sud (AS2-S)	-	-	-	+	-	+
Mille-Îles (MI)	-	+	-	-	-	+

+ = présence de l'espèce correspondante au amorces indiquées ; - = absence de l'espèce.

Tableau 3 : Résultats obtenus à partir des amplifications faites en présence des amorces spécifiques internes et de 2 µl du produit du premier PCR.

	H11- G/H11-D	H3N- G/H3N-D	O2N- G/O2N-D	B2N- G/B2N-D	P4N- G/P4N-D	CK1N- G/CK1N-D
Mille-Îles (R1)	-	-	-	-	-	-
Mille-Îles (R2)	-	-	-	-	-	-
Assomption 1 (AS1)	-	-	-	+	-	+
Assomption 2 Nord (AS2-N)	-	-	-	+	-	+
Assomption 2 Sud (AS2-S)	-	-	-	+	-	+
Mille-Îles (MI)	-	+	-	-	(+)	+

+ = présence de l'espèce correspondante au amorces indiquées ; - = absence de l'espèce.

(+) = différence entre le PCR simple et le PCR interne.

3.7 Eaux usées

Des échantillons d'eaux usées ont été prélevés à la station d'épuration de Fabreville (F1 le 9 mai 2006, F2 le 16 mai 2006 et F3 le 7 juin 2006) et à la station d'épuration d'Auteuil (A1 le 19 avril 2006 et A2 le 7 juin 2006), et l'ADN total en a été extrait. Les volumes d'eaux usées qui ont été filtrés sur une membrane filtrante en nylon de porosité 0.22 μm ont été les suivants : 300 ml de l'échantillon F1, 289 ml de l'échantillon F2, 200 ml de l'échantillon F3, 300 ml de l'échantillon A1 et 300 ml de l'échantillon A2. L'eau dans l'échantillon F3, provenant de la station d'épuration de Fabreville, était marquée par sa couleur sombre et par la présence de débris à la différence des deux autres échantillons F1 et F2, provenant de la même place et prélevés à des jours différents. Le tableau 4 montre les résultats obtenus suite aux amplifications PCR simples en utilisant les amorces spécifiques simples (Humito 1, Humito 3, Ovmito 2, Bomito 2, Pomito 4 et Ckmito 1) et en présence des ADN extraits de chaque échantillon. Le tableau 5 montre les résultats obtenus suite aux amplifications PCR internes en utilisant les amorces spécifiques internes (Humito N 1, Humito N 3, Ovmito N 2, Bomito N 2, Pomito N 4 et Ckmito N 1) et en présence de 2 μl du produit du premier PCR.

L'amplification PCR de l'ADN extrait des eaux usées (affluents) de la station d'Auteuil et de la station de Fabreville avec les amorces spécifiques simples a permis de détecter avec succès les espèces suivantes : l'humain et le bovin dans les échantillonnages A1, A2, F1 et F2 ; l'humain, le bovin et le poulet dans l'échantillonnage F3. À noter que plusieurs quantités d'ADN allant de 50 ng jusqu'à 400 ng ont été testées pour arriver à ces résultats. Pour ce qui est des amorces spécifiques internes (tableau 5), certains ADN mitochondriaux qui n'ont pas pu être détectés avec le PCR simple (tableau 4) ont été détectés avec le PCR interne. En plus de l'ADN humain et du boeuf présents dans A1 et A2 (eaux usées d'Auteuil), de l'ADN de mouton et de porc ont été détectés par les amorces spécifiques internes. Dans les échantillons d'eaux usées de Fabreville F1 et F2, l'espèce ovine, en plus de l'humain et du bovin, apparaît avec le PCR interne. Finalement, pour l'échantillon F3, toutes les espèces ont été détectées avec le PCR interne.

Tableau 4 : Résultats obtenus à partir des amplifications faites en présence des amorces spécifiques simples et de l'ADN extrait des eaux usées.

	H1-G/H1-D	H3-G/H3-D	O2-G/O2-D	B2-G/B2-D	P4-G/P4-D	CK1-G/CK1-D
Auteuil 1 (A1)	+	+	-	+	-	-
Auteuil 2 (A2)	+	+	-	+	-	-
Fabreville 1 (F1)	+	+	-	+	-	-
Fabreville 2 (F2)	+	+	-	+	-	-
Fabreville 3 (F3)	+	+	-	+	-	+

+ = présence de l'espèce correspondante au amorces indiquées ; - = absence de l'espèce.

Tableau 5 : Résultats obtenus à partir des amplifications faites en présence des amorces spécifiques internes et de 2 µl du produit du premier PCR.

	H11- G/H11-D	H3N- G/H3N-D	O2N- G/O2N-D	B2N- G/B2N-D	P4N- G/P4N-D	CK1N- G/CK1N-D
Auteuil 1 (A1)	+	+	(+)	+	(+)	-
Auteuil 2 (A2)	+	+	(+)	+	(+)	-
Fabreville 1 (F1)	+	+	(+)	+	-	-
Fabreville 2 (F2)	+	+	(+)	+	-	-
Fabreville 3 (F3)	+	+	(+)	+	(+)	+

+ = présence de l'espèce correspondante au amorces indiquées ; - = absence de l'espèce.
(+) = différence entre le PCR simple et le PCR interne.

3.8 Lisier de porc

L'ADN total d'environ 500 µl de lisier de porc brut ont été extraits et utilisé dans des PCR simple et PCR interne (Fig. 8). Seul, l'ADN mitochondrial de porc a été détecté dans le lisier. Le panneau A de la figure 8 montre une seule bande avec la paire d'amorces spécifique Pomito 4 et une autre bande avec la paire d'amorces spécifique interne Pomito N-4 (panneau B).

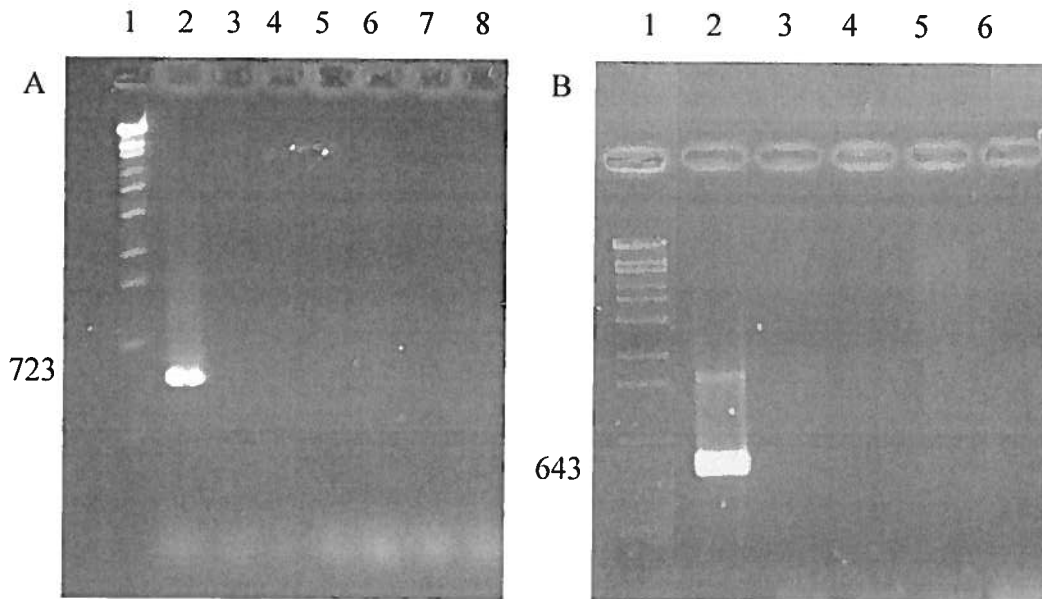


Figure 8 : Amplification d'ADN mitochondrial de 500 µl du lisier de porc brut. **A**) PCR simple avec les amorces Pomito 4 (2) Humito 3(3), Ovmito 2 (4), Bomito 2 (5) et Ckmito 1 (6). Puits 7 et 8 : contrôles négatifs. **B**) PCR interne avec les amorces internes Pomito N- 4 (2), Humito N- 3 (3), Ovmito N- 2 (4), Bomito N- 2 (5) et Ckmito N- 1 (6). Puits 1 : les marqueurs de poids moléculaire λ SryI.

3.9 Persistance de l'ADN

Certains échantillons d'eau de rivières et d'eaux usées ont été conservés à 4°C pour plusieurs mois. L'ADN total de ces échantillons déjà testés auparavant a été extrait et l'amplification de l'ADN mitochondrial a été effectuée pour étudier la persistance de l'ADN après plusieurs mois (7 à 9 mois plus tard). Les échantillons dont l'ADN a été extrait étaient : l'échantillon F3 provenant de la station d'épuration de Fabreville, l'échantillon A2 provenant de la station d'épuration d'Auteuil, l'échantillon AS1 provenant de la rivière l'Assomption et l'échantillon MI provenant de la rivière des Mille-Îles . Les échantillons ont été brassés avant d'extraire la matière retenue sur une membrane filtrante de 0,22 µm. Des PCR simples et internes ont été faits avec les amorces spécifiques à chacune des cinq espèces. Aucun des PCR simples n'ont amplifié des séquences mitochondriales. Par contre, les PCR internes ont amplifié l'ADN mitochondrial de certaines espèces (Fig. 9). Les résultats ont été comparés avec ceux de PCR internes obtenus précédemment aux tableaux 3 et 5 sur les échantillons d'eau (voir les résultats avec les échantillons F3, A2, AS1, et MI). Certains ADN ne sont pas ressortis lors de la deuxième amplification : l'ADN de l'humain et du porc dans l'échantillon F3 ; l'ADN des cinq espèces dans l'échantillon A2 ; et l'ADN de porc dans l'échantillon M1. Par contre, l'ADN mitochondrial de toutes les espèces a persisté dans l'échantillon AS1 (Tableau 6).

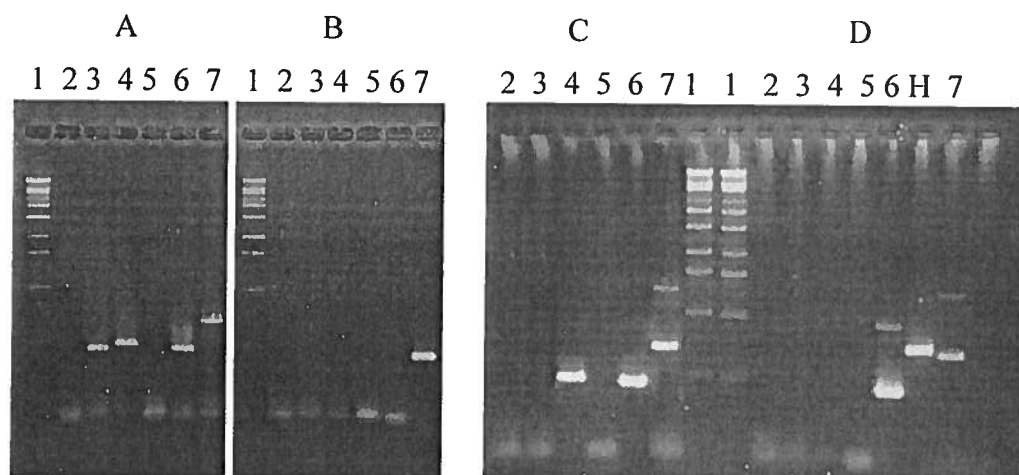


Figure 9 : PCR internes avec l'ADN extrait après quelques mois de conservation des échantillons d'eau à 4°C. **A)** PCR interne en présence de l'ADN extrait de l'échantillon F3 provenant de la station d'épuration de Fabreville. **B)** PCR interne en présence de l'ADN extrait de l'échantillon A2 provenant de la station d'épuration d'Auteuil. **C)** PCR interne en présence de l'ADN extrait de l'échantillon AS1 provenant de la rivière l'Assomption. **D)** PCR interne en présence de l'ADN extrait de l'échantillon MI provenant de la rivière des Mille-Îles. Les amorces spécifiques internes utilisées étaient Humito-11 (2), Ovmito N-2 (3), Bomito N-2 (4), Pomito N-4 (5), Ckmito N-1 (6) et Humito N-3 (puits H). Puits 1 : les marqueurs de poids moléculaire λ *StyI*. Puits 7 : contrôle positif.

Tableau 6 : Présence ou absence de l'ADN mitochondrial dans l'ADN des échantillons d'eau après quelques mois de conservation

	Humito 11		Ovmito N-2		Bomito N-2		Pomito N-4		Ckmito N-1	
	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007
F3	+	(-)	+	+	+	+	+	(-)	+	+
A2	+	(-)	+	(-)	+	(-)	+	(-)	+	(-)
As1	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
MI	-	-	-	-	-	-	+	(-)	+	+

+ = la présence de l'espèce en étude ; - = l'absence de l'espèce en étude.

(-) = différence entre le résultat de PCR interne (été 2006) et le PCR interne (février 2007).

3.10 Élaboration des amorces universelles

La détection de cinq différentes espèces dans un échantillon requiert 5 réactions de PCR séparément, voire même 5 autres avec l'approche des PCR internes. Pour simplifier ce travail, la possibilité d'appliquer un seul PCR, capable de viser les 5 espèces en même temps et en utilisant une seule paire d'amorces, s'est imposée comme étant un bon choix pour amplifier les ADN mitochondriaux des cinq espèces. Pour ce faire, des amorces dites universelles capables d'amplifier l'ADN mitochondrial des cinq espèces en même temps ont été élaborées.

La conception des amorces universelles s'est faite de la manière suivante : les séquences d'ADN mitochondrial de l'humain, du mouton, du bœuf, du porc et de poulet ont été alignées à l'aide du programme Clustal W. Des séquences communes aux cinq espèces, avec une longueur variant entre 18 et 24 pb et ayant de 45% à 55% en GC, ont été choisies. Les quatre paires d'amorces universelles sélectionnées sont : Umito 1 (U1-G/ U1-D), Umito 2 (U2-G/ U2-D2), Umito 2' (U2-G/ U2-D3), et Umito 3(U3-G/ U3-D). Le tableau 7 présenté ci-dessous contient toutes les amorces universelles élaborées. Ces dernières ont aussi été testées avec l'ADN extrait de chaque espèce. (Fig. 10). A noter que les régions Umito 2 et Umito 2' partage la même amorce de gauche (Umito 2-G), mais une amorce de droite différente, ce qui résulte à un fragment plus long pour la région Umito 2'. Chaque paire d'amorces universelle ciblant l'ADN mitochondrial n'a généré qu'une seule bande ayant la longueur attendue lorsque mise en présence de l'ADN total extrait de l'espèce correspondante. Seule la paire d'amorces universelle U3-G/U3-D en présence de l'ADN de poulet, a généré une bande plus haute que la longueur attendue (panneau D, Puits 5). À noter que l'amorce droite U3-D contient une dégénérescence (G/T) à cause de l'espèce de poulet qui présente dans l'alignement un nucléotide T à la place de G.

Pour vérifier la meilleure température d'hybridation avec les amorces universelles Umito 1, des PCR ont été effectués avec douze températures d'hybridation comprises entre 48°C et 59°C. La température optimale observée a été entre 50°C et 55°C, puisqu'il y a eu apparition des bandes plus intenses en les comparant avec les autres bandes obtenues à d'autres températures (Fig. 11). La température d'amplification 55°C, choisie comme température optimale pour réaliser tous les PCR de ce projet, a été aussi choisie comme

température optimale pour les PCR réalisés avec les amorces universelles : Umito 1, Umito 2, Umito 2' et Umito 3.

Tableau 7 : Liste des amorces universelles

Amorces universelles	Amplicon
Région Umito 1	506 pb
Umito 1-G 5'- AAAGTGGGATTAGATACCCAC - 3'	
Umito 1-D 5'- CTTACCWTGTTACGACTTG - 3'	
Région Umito 2	235 pb
Umito 2-G 5'- AAGACGAGAAGACCCTRTGGA - 3'	
Umito 2-D2 5'- GATTGCGCTGTTATCCCT - 3'	
Région Umito 2'	289 pb
Umito 2-G 5'-AAGACGAGAAGACCCTRTGGA - 3'	
Umito 2-D3 5'-TGATCCAACATCGAGGTCGT - 3'	
Région Umito 3	401 pb
Umito 3-G 5'- TAAGCTATCGGGCCCATACC - 3'	
Umito 3-D 5'- TCTGGGAMTCAGAAGTG - 3'	

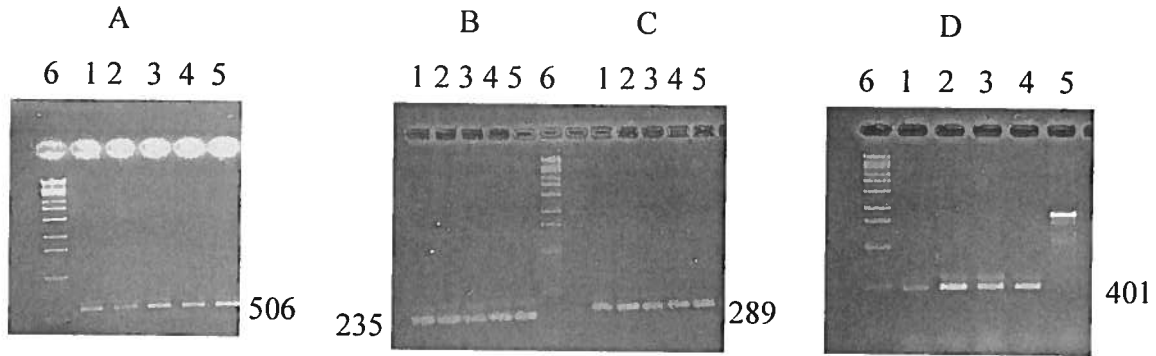


Figure 10: Amplification PCR de l'ADN mitochondrial à partir de l'ADN total extrait des cinq espèces avec les différentes amorces universelles. **A** : avec les amorces U1-G/U1-D. **B** : avec les amorces U2-G/U2-D2. **C** : avec les amorces U2-G/U2-D3. **D** : avec les amorces U3-G/U3-D. Puits 1 : en présence de l'ADN humain. Puits 2 : en présence de l'ADN ovin. Puits 3 : en présence de l'ADN bovin. Puits 4 : en présence de l'ADN porcin. Puits 5 : en présence de l'ADN de poulet. Puits 6 : marqueur de poids moléculaire λ *Sty*I.

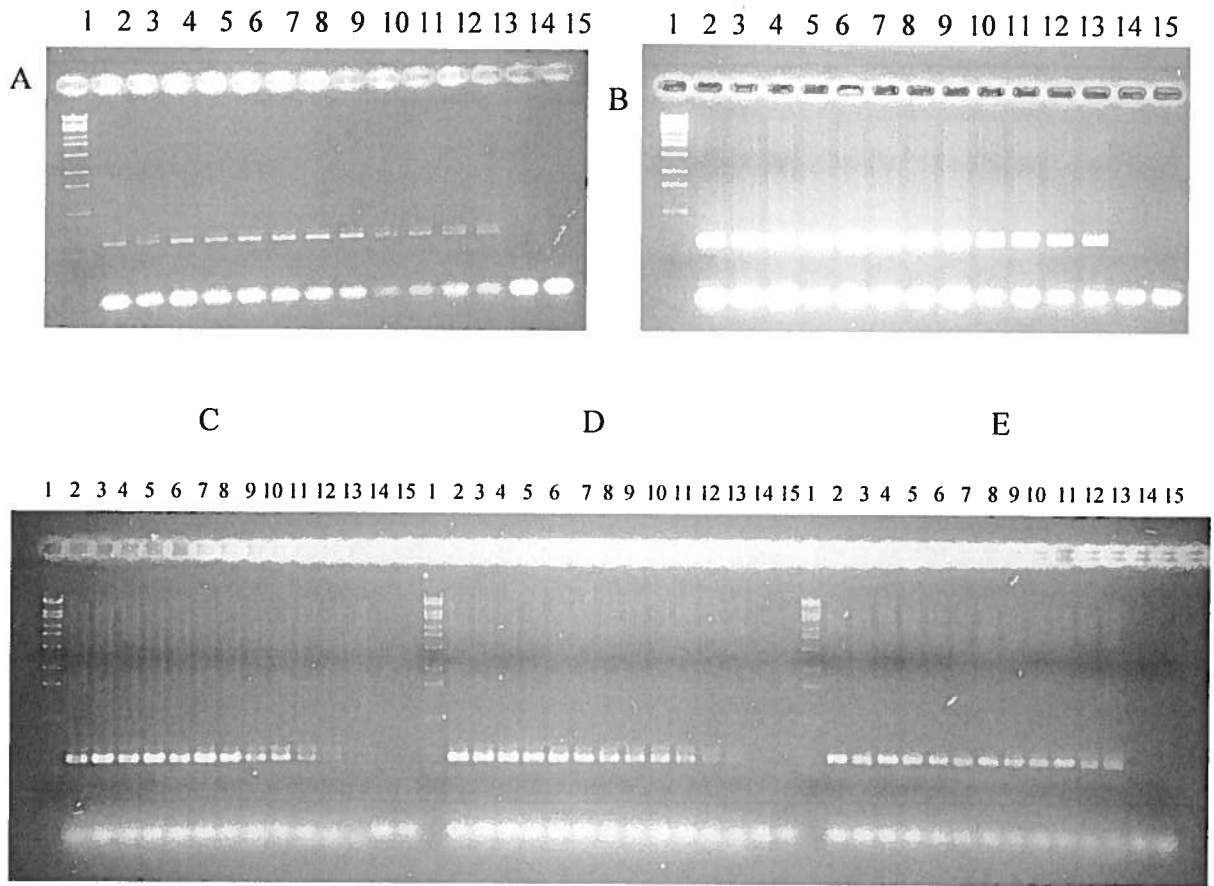


Figure 11 : Amplification PCR à des températures d'hybridation différentes et avec les amorces Umito 1 en présence de l'ADN humain (A), de mouton (B), du bœuf (C), du porc (D) et du poulet (E). Les amplifications ont été effectuées à 48°C (2), 49°C (3), 50°C (4), 51°C (5), 52°C (6), 53°C (7), 54°C (8), 55°C (9), 56°C (10), 57° C (11), 58°C (12), 59°C (13). Puits 1 : le marqueur de poids moléculaire λ *Sty*I. Puits 14-15 : contrôles négatifs.

3.11 Élaboration des oligonucléotides

Tel que décrit dans le paragraphe précédant, les amorces universelles ciblent des séquences communes du génome mitochondrial des cinq espèces. Ces amorces universelles communes aux cinq espèces, bordent une ou des régions variables uniques à chaque espèce (Fig. 12, 13, 14). Pour chaque région, un oligonucléotide représentant une séquence unique à chaque espèce ont été choisies. Au total pour les 3 régions, 15 oligonucléotides de 50 à 57 nucléotides et avec un pourcentage en GC variant entre 30% et 42% ont été conçus. Le complément inverse de chacun de ces 15 oligonucléotides a également été développé. Ainsi, pour chaque région, nous aurons deux oligonucléotides spécifiques à chaque espèce. Les tableaux 8, 9 et 10 montrent les 15 oligonucléotides spécifiques à chaque espèce ainsi que leurs compléments inverses indiqués sous le nom de DB-RC.

À noter aussi que la séquence des espèces prises deux à deux ont aussi été alignées ensemble (humain/mouton, humain/bœuf, humain/porc, humain/poulet, mouton/bœuf, mouton/porc, mouton/poulet, bœuf/porc, bœuf/poulet et porc/poulet) pour être certain du choix spécifique des oligonucléotides.

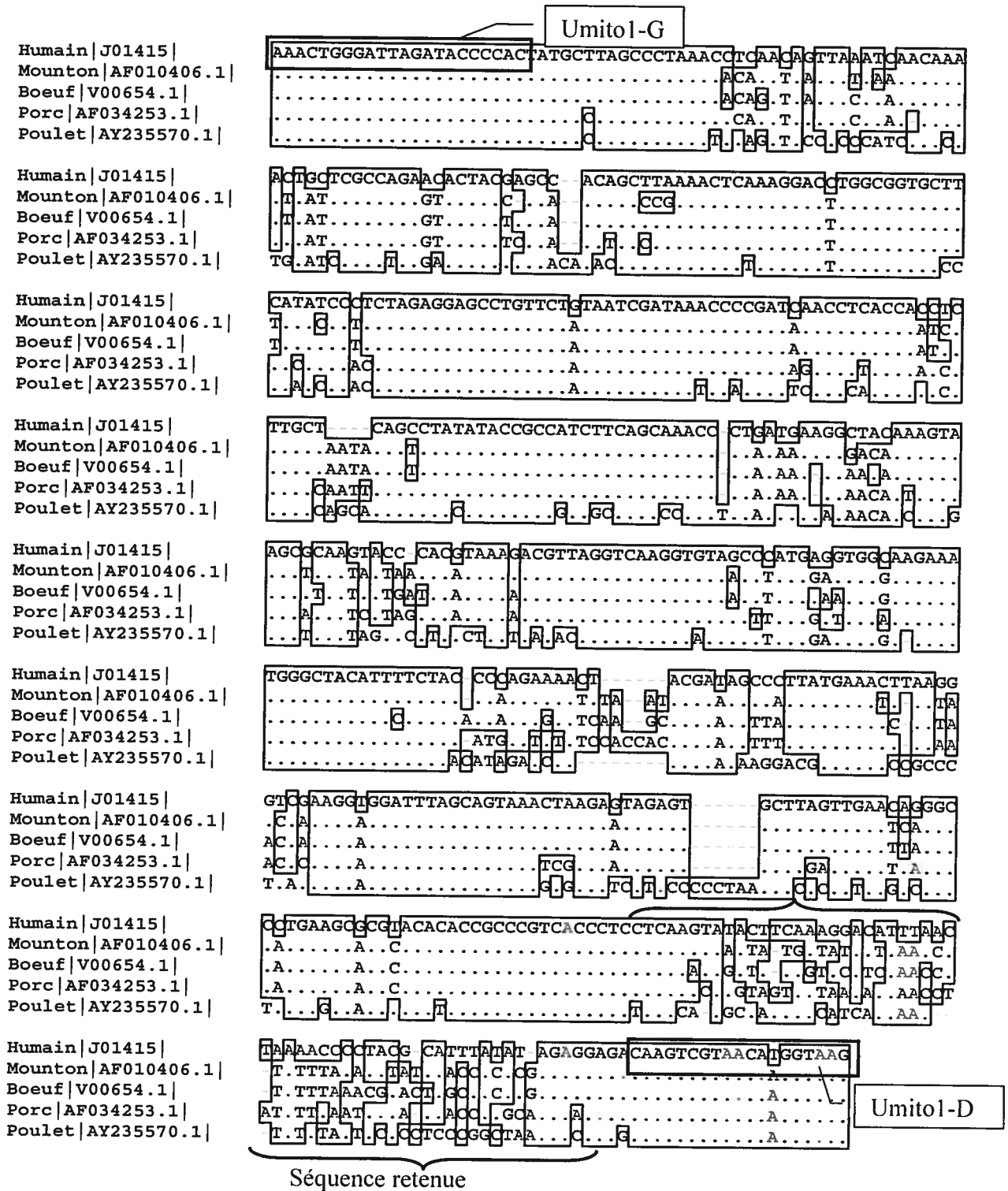


Figure 12: Alignement des cinq séquences mitochondriales ayant conduit aux amorces universelles Umito 1 capables d'amplifier la région 1, et à la séquence spécifique de cette région. Les points représentent les nucléotides communs à l'espèce humaine.

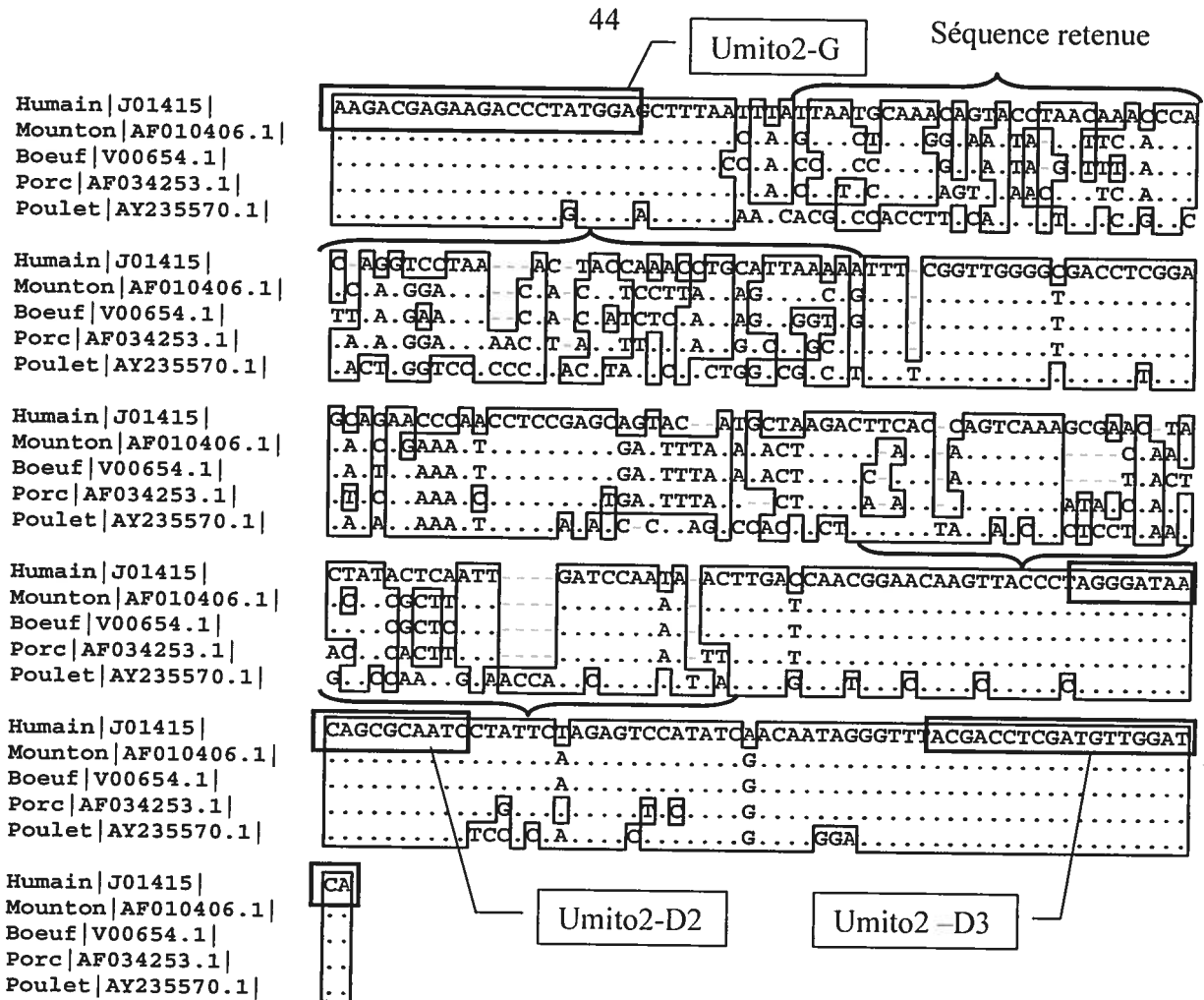


Figure 13: Alignement des cinq séquences mitochondriales ayant conduit aux amorces universelles Umito 2 et Umito 2' capables d'amplifier la région 2 et la région 2', et à la séquence spécifique de cette région.

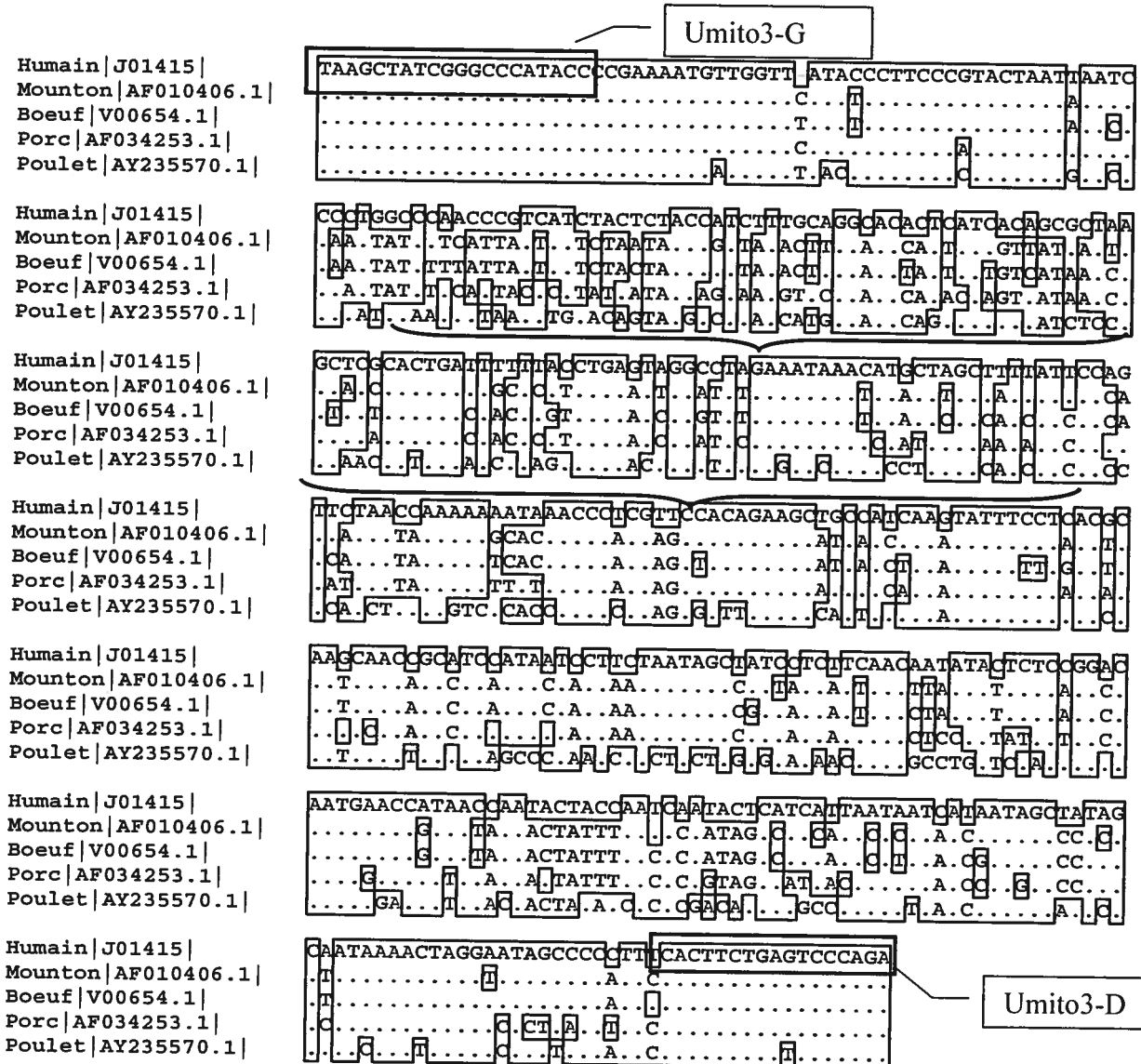


Figure 14: Alignement des séquences mitochondriales ayant conduit aux amorces universelles Umito 3 capables d'amplifier la région 3, et à la séquence spécifique de cette région.

Tableau 8 : Séquence des oligonucléotides spécifiques de la région 1

Région 1 limitée par U1-G / U1-D
<p>Humain :</p> <p>Humito1-U1-DB GTATACTTCAAAGGACATTTAACTAAAACCCCTACGCATTTATATAGAGG</p> <p>Humito1-U1-DB-RC CCTCTATATAAATGCGTAGGGGTTTTAGTTAAATGTCCTTTGAAGTATAC</p>
<p>Ovin :</p> <p>Ovmito1-U1-DB GTAAATATGATATACTTAAACCTATTTACATATATCAACCACACGAGAGG</p> <p>Ovmito1-U1-DB-RC CCTCTCGTGTGGTTGATATATGTAATAGGTTTAAGTATATCATATTTAC</p>
<p>Bovin :</p> <p>Bomito1-U1-DB AATAGATTCAGTGCATCTAACCCCTATTTAAACGCACTAGCTACATGAGAG</p> <p>Bomito1-U1-DB-RC CTCTCATGTAGCTAGTGCGTTTAAATAGGGTTAGATGCACTGAATCTATT</p>
<p>Porc :</p> <p>Pomito1-U1-DB CCTCAAGCATGTAGTAATAAAAATAACCTATATTCAATTACACAACCATGCAA</p> <p>Pomito1-U1-DB-RC CTTGCATGGTTGTGTAATTGAATATAGGTTATTTTTATTACTACATGCTTGAGG</p>
<p>Poulet :</p> <p>CKmito1-U1-DB TTCACAAGCCATCAACATCAATAAATATATACTTCCCCTCCCGGCTAAAGA</p> <p>CKmito1-U1-DB-RC TCTTTAGCCGGGAGGGGAAGTATATATTTATTGATGTTGATGGCTTGTAAG</p>

Humito pour l'humain, Ovmito pour le mouton, Bomito pour le bœuf, Pomito pour le porc et Ckmito pour le poulet. La lettre U désigne les amorces universelles. DB: dot blot. RC: séquences compléments inverses.

Tableau 9 : Séquence des oligonucléotides spécifiques de la région 2.

Région 2 : limitée par U2-G / U2-D2 et U2-G /U2-D3
<p>Humain :</p> <p>Humito2-U2-DB AAACAGTACCTAACAAACCCACAGGTCCTAAACTACCAAACCTGCATTAAAAA Humito2-U2-DB-RC TTTTTAATGCAGGTTTGGTAGTTTAGGACCTGTGGGTTTGTTAGGTACTGTTT</p>
<p>Ovin :</p> <p>Ovmito2-U2-DB GTA ACTCAAGGAAAATAAATTCAACCACCAAGGGATAACAACACTCCTTA Ovmito2-U2-DB-RC TAAGGAGTGTTGTTATCCCTTGGTGGTTGAATTTATTTTCCTTGAGTTAC</p>
<p>Bovin :</p> <p>Bomito2-U2-DB CCAACCCAAAGAGAATAGATTTAACCATTAAGGAATAACAACAATCTCCATGA Bomito2-U2-DB-RC CTCATGGAGATTGTTGTTATTCCTTAATGGTTAAATCTATTCTCTTTGGGTTGG</p>
<p>Porcin :</p> <p>Pomito2-U2-DB CCAAAAGTTAAACA ACTCAACCACAAAGGGATAAAACATAACTTAACATGGAC Pomito2-U2-DB GCTAGTCCATGTTAAGTTATGTTTTATCCCTTTGTGGTTGAGTTGTTTAACTTTT</p>
<p>Poulet :</p> <p>CKmito2-U2-DB TTCACTAAGACCAACTCCTCAAAGTACCAACAGTAACCAGACCCAATATAA CKmito2-U2-DB-RC TTATATTGGGTCTGGTTACTGTTGGTACTTTGAGGAGTTGGTCTTAGTGAA</p>

Tableau 10 : Séquence des oligonucléotides spécifiques de la région 3.

Région 3 : limité par U3-G / U3-D
<p>Humain :</p> <p>Humito3-U3-DB TCGCACTGATTTTTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATAAACATGCTAGCTTT</p> <p>Humito3-U3-DB-RC AAAGCTAGCATGTTTATTTCTAGGCCTACTCAGGTAAAAAATCAGTGCGA</p>
<p>Ovin :</p> <p>Ovmito3-U3-DB AACCGTTATACTTGGAACCATTATCGTTATGATTAGCACCCACTGATTGCTCAT</p> <p>Ovmito3-U3-DB-RC ATGAGCAATCAGTGGGTGCTAATCATAACGATAATGGTTCCAAGTATAACGGTT</p>
<p>Bovin :</p> <p>Bomito3-U3-DB CTACTAACCATTATACTAGGAACTATTATTGTCATAATCAGTTCTCACTG</p> <p>Bomito3-U3-DB-RC CAGTGAGAACTGATTATGACAATAATAGTTCCTAGTATAATGGTTAGTAG</p>
<p>Porcin :</p> <p>Pomito3-U3-DB CACTACCCTTATCATAACAGTAATGTCCGGAACCATACTAGTAATAATCAGCT</p> <p>Pomito3-U3-DB-RC AGCTGATTACTAGTATGGTTCCGGACATTACTGTTATGATAAGGGTAGTG</p>
<p>Poulet :</p> <p>CKmito3-U3-DB AAAATAATCTGCACAGTAAGCCTCATCATGGGAACCAGCATCACAATCT</p> <p>CKmito3-U3-DB-RC AGATTGTGATGCTGGTTC CATGATGAGGCTTACTGTGCAGATTAGTTTT</p>

3.12 Application du dot blot

Les amorces universelles ont permis en une seule réaction PCR d'amplifier l'ADN mitochondrial présent dans l'échantillon d'eau en analyse. La discrimination des espèces a été faite par expériences de dot blot. Pour ce faire, les oligonucléotides spécifiques à chaque espèce, ainsi que leurs compléments inverses ont été fixés sur des membranes de nylon (environ 7 cm de largeur et 5.5 cm de longueur) tel que schématisé dans la figure 15. La membrane présentait 5 lignes : les oligonucléotides spécifiques à l'espèce humaine ont été fixés sur la première ligne, les oligonucléotides spécifiques à l'espèce ovine ont été fixés sur la deuxième ligne, Les oligonucléotides spécifiques à l'espèce bovine ont été fixés sur la troisième ligne, les oligonucléotides spécifiques à l'espèce porcine ont été fixés sur la quatrième ligne et les oligonucléotides spécifiques du poulet ont été fixés sur la cinquième ligne.

Lors des amplifications PCR avec les différentes amorces universelles, l'ajout d'un nucléotide marqué au DIG a permis de dériver des amplicons qui ont servi de sondes. Par exemple, si le produit de PCR contenait des séquences humaines et ovines, seuls les oligonucléotides spécifiques à l'humain et l'ovin ont hybridé sur la membrane.

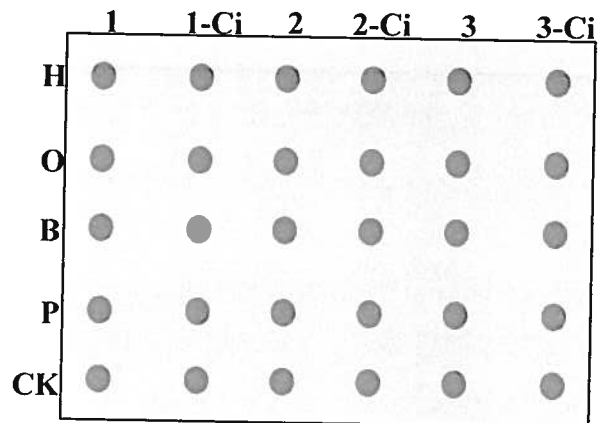


Figure 15 : Modèle d'une membrane en nylon utilisée pour l'expérience du dot blot. Ligne H : les oligonucléotides spécifiques de l'humain. Ligne O : les oligonucléotides spécifiques au mouton. Ligne B: les oligonucléotides spécifiques au boeuf. Ligne P : les oligonucléotides spécifiques au porc. Ligne Ck : les oligonucléotides spécifiques au poulet. Colonne 1 : les oligonucléotides appartenant à la région 1. Colonne 1-Ci : les compléments inverses des oligonucléotides de la région 1. Colonne 2 : les oligonucléotides appartenant à la région 2. Colonne 2-Ci : les compléments inverses des oligonucléotides de la région 2. Colonne 3 : les oligonucléotides appartenant à la région 3. Colonne 3-Ci : les compléments inverses des oligonucléotides de la région 3.

3.13 Hybridation ADN/ADN des tissus spécifiques

Chacune des 4 paires d'amorces universelles a été utilisée sur les ADN extraits de chaque espèce (humain, mouton, bœuf, porc et poulet). Les vingt amplicons marqués au DIG ont hybridé séparément sur les membranes.

Les oligonucléotides de la région 1 ont été spécifiques à chaque espèce (Fig. 16). Aucune hybridation croisée n'a eu lieu entre les espèces ainsi qu'entre les régions. La révélation de 16 heures n'a révélé que 2 spots suite à l'hybridation avec les 2 oligonucléotides (chaque oligonucléotide et son complément inverse) spécifiques à l'espèce.

De la même façon, l'étude de la spécificité des oligonucléotides a été faite avec la région 2. Les oligonucléotides de la région 2 ont été spécifiques à chaque espèce (Fig. 17). Aucune hybridation croisée n'a eu lieu entre les espèces ainsi qu'entre les régions avec les sondes contenant l'ADN spécifique de l'humain, du mouton, de porc et du poulet. La sonde contenant Umito2 et l'ADN de bœuf a été légèrement hybridée avec l'oligonucléotide inverse de l'espèce de porc (2-Ci). Ce résultat est apparu après plusieurs heures de révélation (16 heures). La révélation n'a montré aucune hybridation croisée.

Les oligonucléotides de la région 2' ont été spécifiques à chaque espèce. Aucune hybridation croisée n'a eu lieu entre les espèces ainsi qu'entre les régions. Les oligonucléotides de la région 2' ont été spécifiques à chaque espèce (Fig. 18). La révélation de 16 heures n'a révélé que 2 spots suite à l'hybridation avec les 2 oligonucléotides (chaque oligonucléotide et son complément inverse) spécifiques à l'espèce.

De la même façon, l'étude de la spécificité des oligonucléotides a été faite avec la région 3 (Fig. 19). Aucune hybridation croisée n'a eu lieu entre les espèces ainsi qu'entre les régions avec les sondes contenant l'ADN spécifique du bœuf, du porc et du poulet. La sonde contenant Umito3 et l'ADN humain a été légèrement hybridée avec les oligonucléotides de l'espèce de porc et du mouton. Ce résultat n'est apparu qu'après plusieurs heures de révélation (16 heures). Dans les deux premières heures aucune hybridation croisée n'a été remarquée. Par contre, la même révélation a montré avec les autres espèces 2 spots suite à l'hybridation avec les 2 oligonucléotides (chaque oligonucléotide et son complément inverse).

Après plusieurs essais, il a été bien important de respecter trois règles dans le protocole de dot blot pour éliminer les réactions croisées: 1- augmenter le temps de

préhybridation de la membrane ; 2- respecter les étapes de lavages (voir matériel et méthodes : 2.9 et 2.10) et surtout le lavage le plus stringent avec la solution 0,1X SSPE, SDS 0,1 %, 3- révéler seulement deux heures.

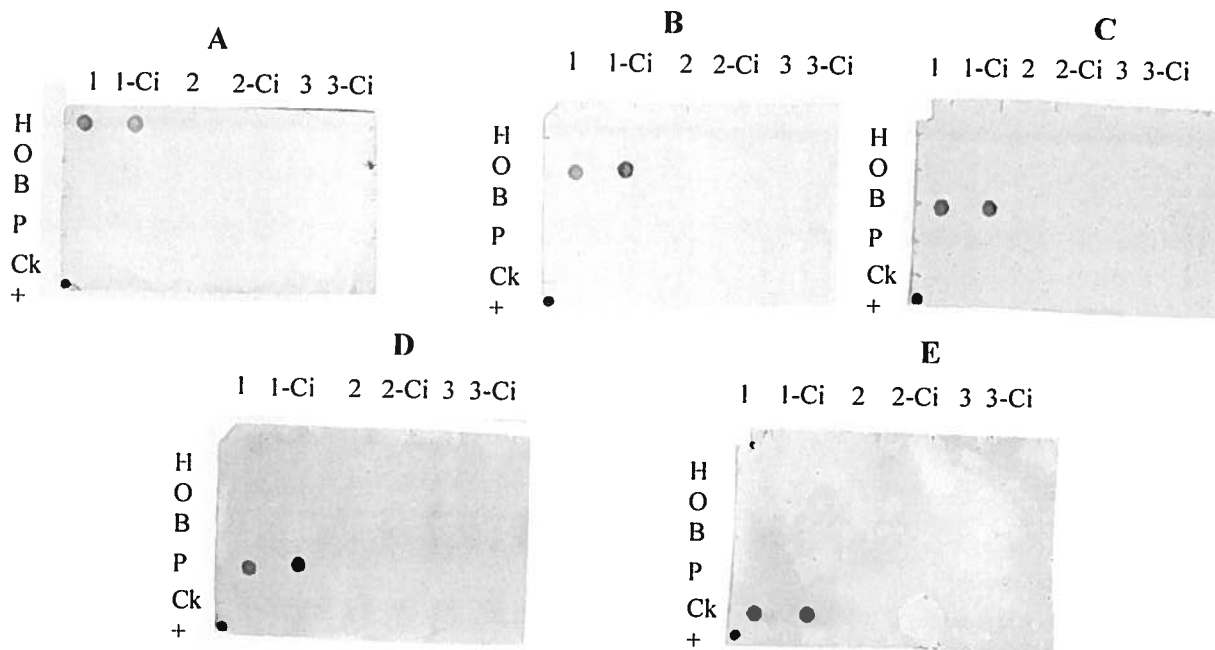


Figure 16 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir des PCR marqués au DIG contenant la paire d'amorces Umito 1 et de l'ADN extrait de chaque espèce. **A)** humain. **B)** mouton. **C)** boeuf. **D)** porc. **E)** poulet. Voir figure 15 pour le gabarit des membranes. (+) : test positif. Durée de révélation= 16 heures.

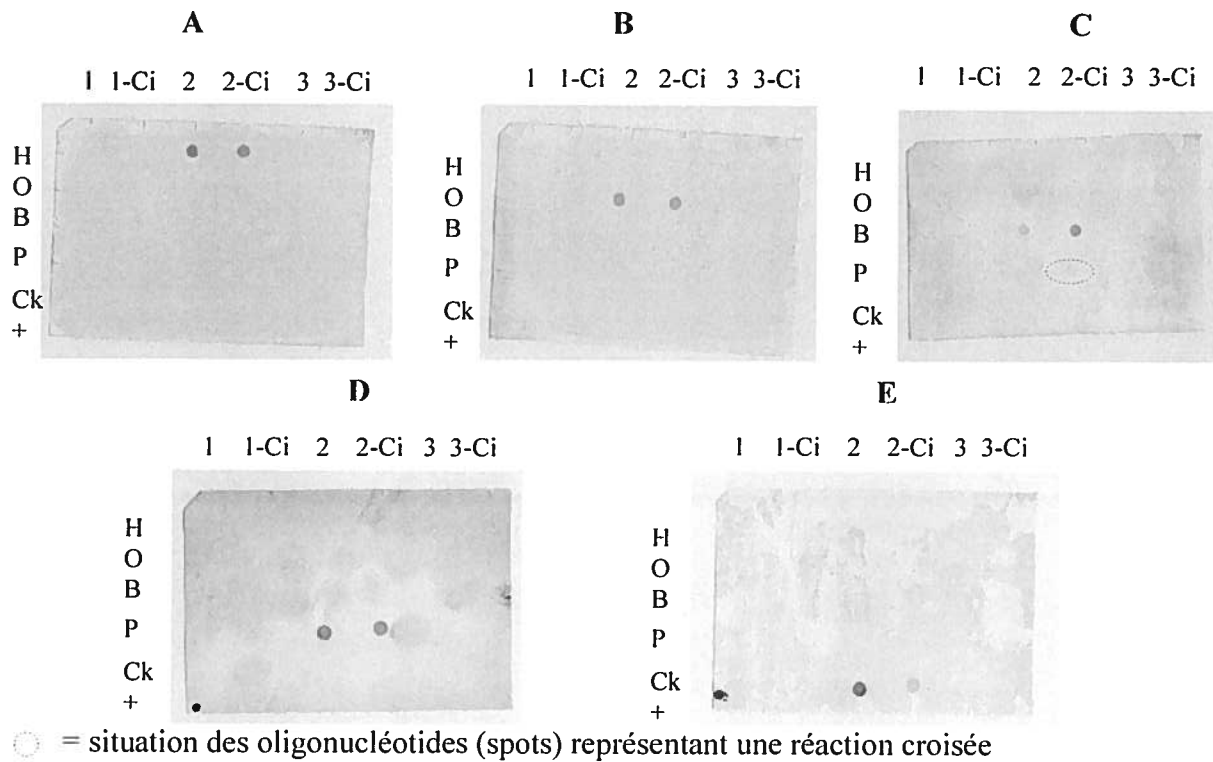


Figure 17 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir des PCR marqués au DIG contenant la paire d'amorces Umito 2 et de l'ADN de chaque espèce. **A)** humain. **B)** mouton. **C)** boeuf. **D)** porc. **E)** poulet. Voir figure 15 pour le gabarit des membranes. (+) : test positif. Durée de révélation= 16 heures.

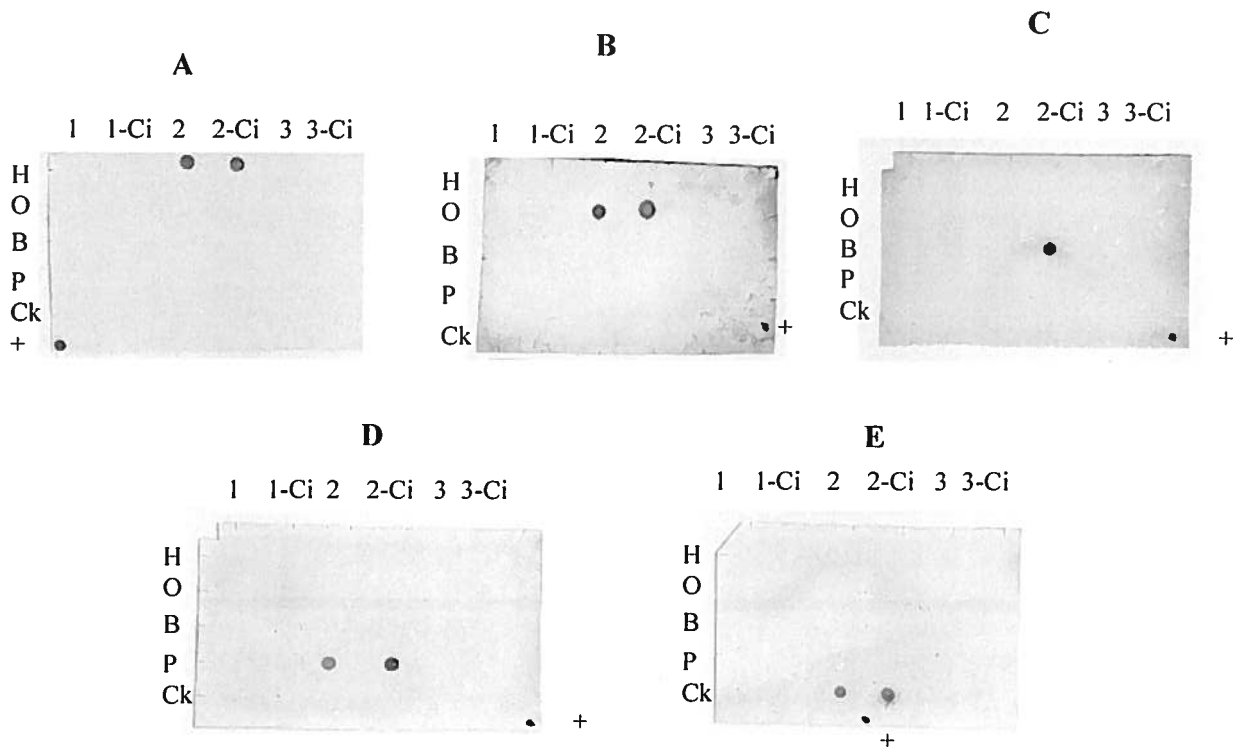
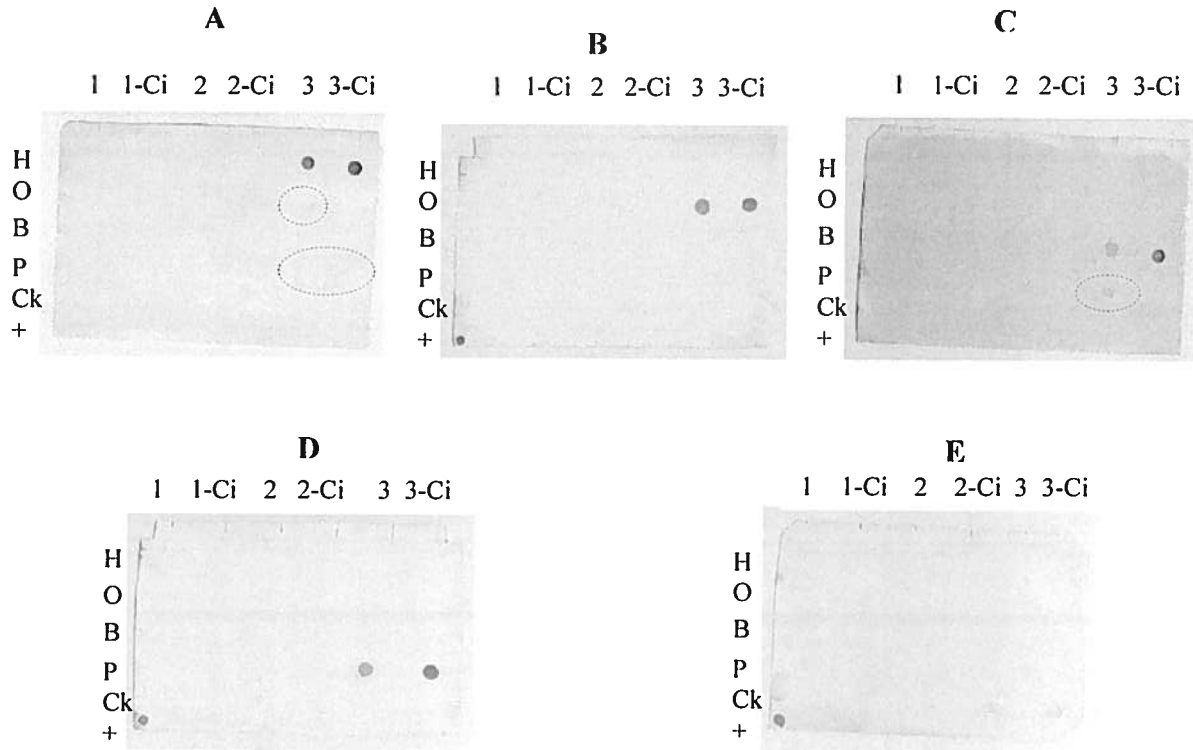


Figure 18 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir des PCR marqués au DIG contenant la paire d'amorces Unito 2' et de l'ADN de chaque espèce. **A)** humain. **B)** mouton. **C)** boeuf. **D)** porc. **E)** poulet. Voir figure 15 pour le gabarit des membranes. (+) : test positif. Durée de révélation = 16 heures.



○ = situation des oligonucléotides (spots) représentant une réaction croisée

Figure 19 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir des PCR marqués au DIG contenant la paire d'amorces Umito 3 et de l'ADN de chaque espèce. **A)** humain. **B)** mouton. **C)** boeuf. **D)** porc. **E)** poulet. Voir figure 15 pour le gabarit des membranes. (+) : test positif. Durée de révélation = 16 heures.

3.14 Hybridation ADN/ADN des échantillons d'eaux

Les expériences dot blot ont été appliquées sur des échantillons d'eaux de rivières: rivière des Mille-Îles au niveau de Sainte Rose (R), rivière l'Assomption (As1) et rivière des Mille-Îles (MI) au niveau de Rosemère; et d'eaux usées : station d'épuration d'Auteuil (A1 et A2) et station d'épuration de Fabreville (F1, F2 et F3). Des amplifications PCR (avec marquage au DIG) avec les paires d'amorces universelles ont été effectuées sur de l'ADN extrait de ces échantillons. Par la suite, des hybridations sur des membranes dot blot ont été réalisées pour déterminer la présence ou l'absence de chaque espèce.

3.14.1 Région Umitol

La technique de dot blot a révélé la présence de l'humain, le mouton, le bœuf et le porc dans les eaux usées de la station d'Auteuil (Fig. 20). L'eau de la rivière l'Assomption (niveau Repentigny) contenait l'ADN du bœuf et du poulet. L'eau de rivière des Mille-Îles au niveau de Rosemère contenait l'ADN de l'humain, du porc et du poulet. Les eaux usées de la station de Fabreville ont montré des résultats dépendamment de l'échantillonnage. L'échantillon F1 contenait 3 espèces : l'humain, l'ovin, et le bovin. L'échantillon F3 contenait les cinq espèces.

Une analyse comparative entre la technique dot blot et celle du PCR interne avec les amorces spécifiques internes (Tableau 11) a été faite pour évaluer les résultats. La technique de dot blot a révélé les mêmes résultats que le PCR interne appliqué sur les échantillons d'eaux.

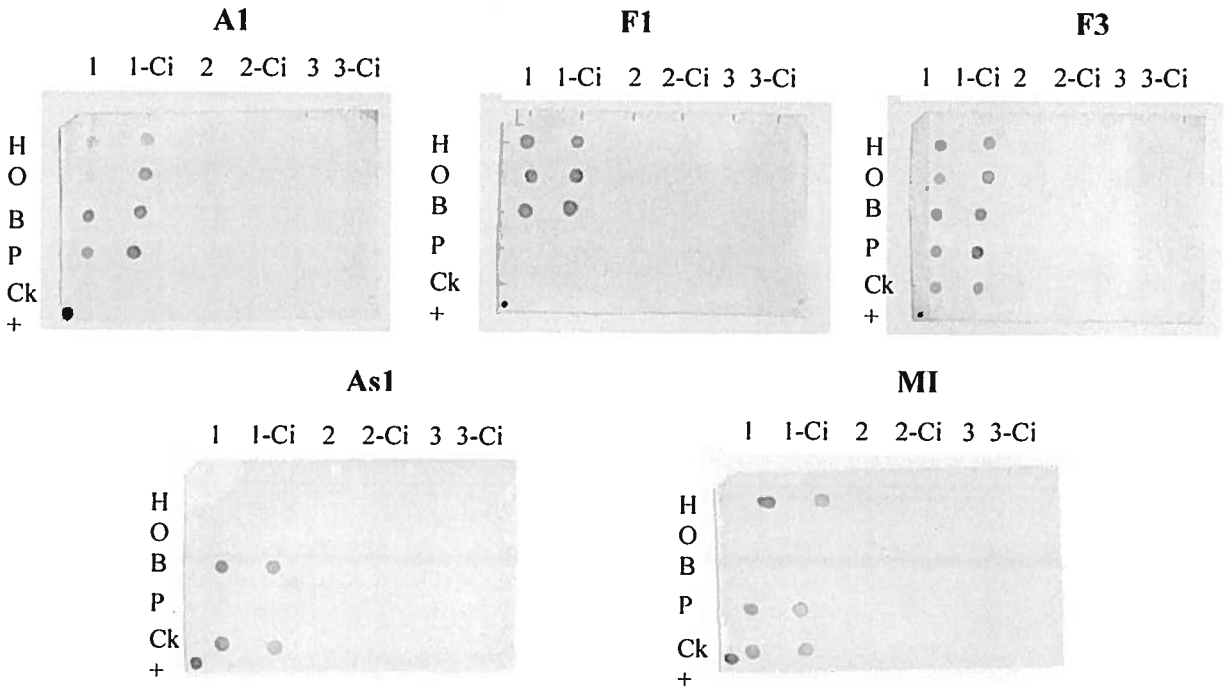


Figure 20 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir de l'ADN extrait de différents échantillons d'eaux A1, F1, F3, As1 et MI et les amorces Umito 1. **A1)** premier échantillonnage des eaux usées d'Auteuil. **F1)** premier échantillonnage des eaux usées de la station d'épuration de Fabreville. **F3)** troisième échantillonnage des eaux usées de la station d'épuration de Fabreville. **As1)** rivière l'Assomption. **MI)** rivière des Mille-Îles. Voir figure 15 pour le gabarit des membranes. (+) : test positif. Durée de révélation = 16 heures.

Tableau 11 : Analyse comparative entre le PCR interne et le dot blot réalisée avec la sonde contenant la paire d'amorces Umito1 et de l'ADN extrait des échantillons.

Espèces	Auteuil A1		Fabreville F1		Fabreville F3		Assomption As		Mille-Îles MI	
	DB	PCRi	DB	PCRi	DB	PCRi	DB	PCRi	DB	PCRi
Humain	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Ovin	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Bovin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Porcin	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Poulet	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+ = présence de l'espèce; - = absence de l'espèce.

3.14.2 Région Umito2

La technique de dot blot a révélé la présence de l'humain, du mouton, du bœuf et du porc dans les eaux usées de la station d'Auteuil (A2) (Fig. 21). L'eau de rivière de l'Assomption As1 (niveau Repentigny) contenait l'ADN du bœuf, du porc et du poulet. L'eau de rivière des Mille-Îles (MI) contenait l'ADN de l'humain, du porc et du poulet. Les eaux usées de la station de Fabreville ont montré des résultats dépendamment de l'échantillonnage. L'échantillon F2 contenait 4 espèces : l'humain, l'ovin, le bovin et le porc. L'échantillon F3 contenait les cinq espèces.

Deux différences ont été remarquées avec les résultats obtenus dans le PCR interne (Tableau 12). Avec la technique de dot blot, les eaux usées de la station de Fabreville (F2) contenait l'espèce de porc tandis que le résultat de PCR interne n'a pas montré cela. L'eau de rivière de l'Assomption (niveau Repentigny) contenait l'ADN de porc ce qui n'a pas été révélé avec le PCR interne.

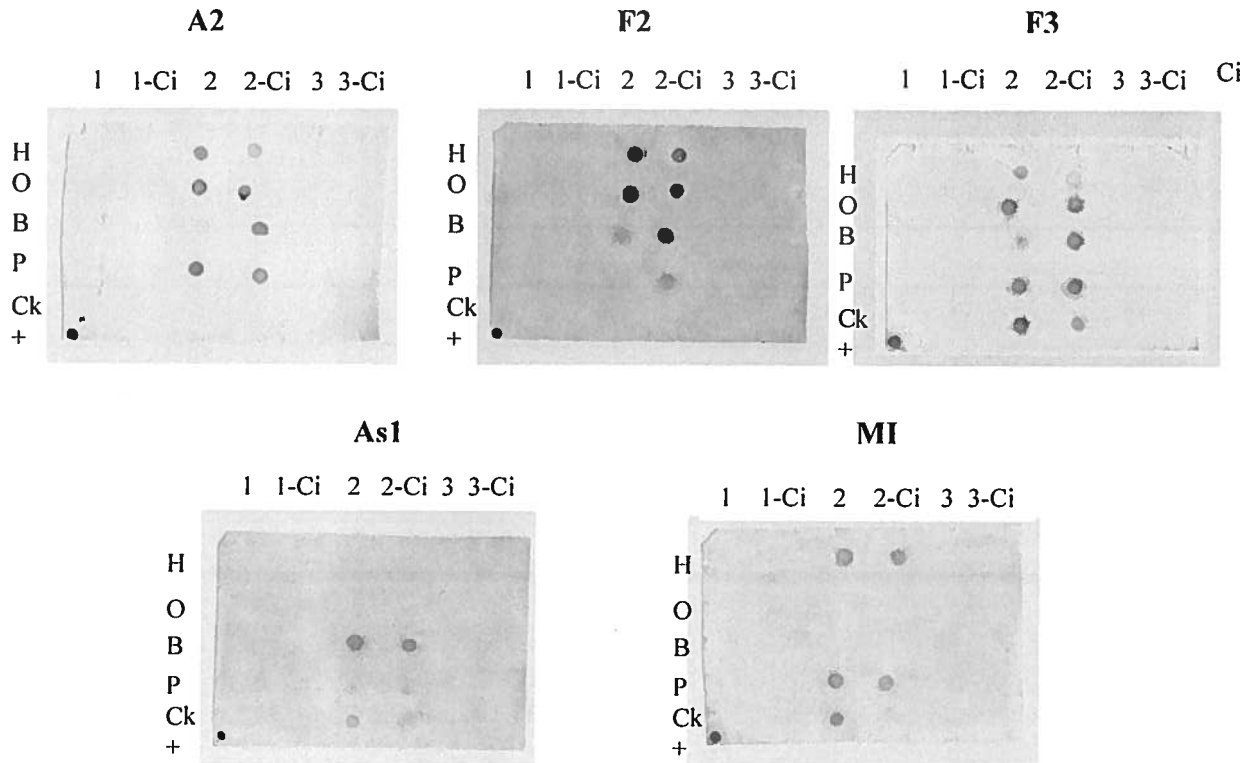


Figure 21 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir de l'ADN extrait de différents échantillons d'eaux A2, F2, F3, As1 et MI et les amorces Umito 2. **A2)** deuxième échantillonnage des eaux usées d'Auteuil. **F2)** second échantillonnage des eaux usées de la station d'épuration de Fabreville. **F3)** troisième échantillonnage des eaux usées de la station d'épuration de Fabreville. **As1)** rivière l'Assomption. **MI** rivière des Mille-îles. Voir figure 15 pour le gabarit des membranes. (+) : test positif. Durée de révélation = 16 heures.

Tableau 12 : Analyse comparative entre le PCR interne et le dot blot réalisée avec la sonde contenant la paire d'amorces Umito2 et l'ADN extrait de certains échantillons d'eau.

Espèces	Auteuil A2		Fabreville F2		Fabreville F3		Assomption As		Mille-Îles MI	
	DB	PCRi	DB	PCRi	DB	PCRi	DB	PCRi	DB	PCRi
Humain	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Ovin	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Bovin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Porcin	+	+	(+)	-	+	+	(+)	-	+	+
Poulet	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+ = présence de l'espèce; - = absence de l'espèce.

(+) = différence entre le résultat de PCR interne et le résultat de dot blot (DB).

3.14.3 Région Umito2'

La technique de dot blot a révélé la présence de l'humain, le mouton, le bœuf et le porc dans les eaux usées de la station d'Auteuil (A1) (Fig. 22). L'eau de rivière de l'Assomption As1 (niveau Repentigny) contenait l'ADN du bœuf, du porc et du poulet. L'eau de rivière des Mille-Îles au niveau de Rosemère (MI) contenait l'ADN de l'humain, du porc et du poulet. Les eaux usées de la station de Fabreville ont montré des résultats dépendamment de l'échantillonnage. L'échantillon F2 contenait 4 espèces : l'humain, l'ovine, le bovin et le porc. L'échantillon F3 contenait les cinq espèces.

La technique de dot blot, appliquée avec la paire d'amorces Umito 2', a révélé les mêmes différences obtenues avec la paire d'amorces Umito 2 en les comparant avec le PCR interne (Tableau 13). Les eaux usées de la station d'Auteuil étaient contaminées par l'ADN de porc. L'eau de rivière de l'Assomption (niveau Repentigny) contenait aussi l'ADN de porc.

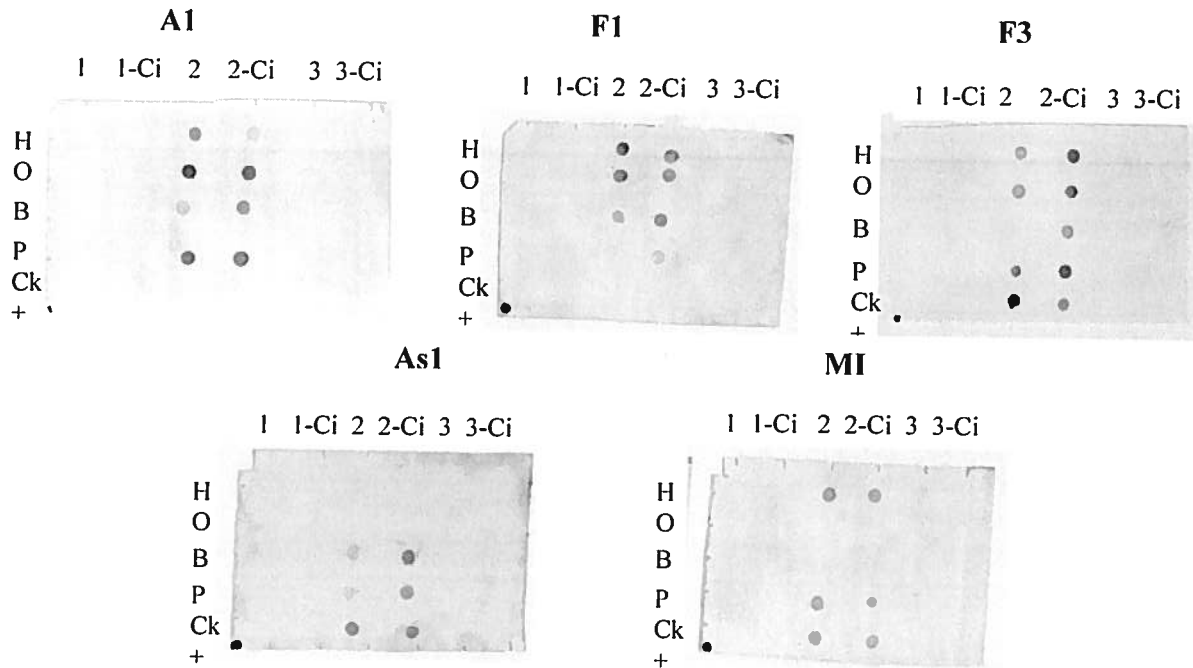


Figure 22 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir de l'ADN extrait de différents échantillons d'eaux A1, F1, F3, As1 et MI et les amorces Umito 2'. **A1)** premier échantillonnage des eaux usées d'Auteuil. **F1)** premier échantillonnage des eaux usées de la station d'épuration de Fabreville. **F3)** troisième échantillonnage des eaux usées de la station d'épuration de Fabreville. **As1)** rivière l'Assomption. **MI)** rivière des Mille-îles. Voir figure 15 pour le gabarit des membranes. (+) : test positif. Durée de révélation = 16 heures.

Tableau 13 : Analyse comparative entre le PCR interne et le dot blot réalisé avec la sonde contenant la paire d'amorces Umito2'et l'ADN extrait de certains échantillons.

Espèces	Auteuil A1		Fabreville F1		Fabreville F3		Assomption As		Mille-Îles MI	
	DB	PCRi	DB	PCRi	DB	PCRi	DB	PCRi	DB	PCRi
Humain	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Ovin	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Bovin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Porcin	+	+	(+)	-	+	+	(+)	-	+	+
Poulet	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+ = présence de l'espèce; - = absence de l'espèce.

(+) = différence entre le résultat de PCR interne et le résultat de dot blot (DB).

3.14.4 Région Umito3

La technique de dot blot, appliquée avec la paire d'amorces Umito 3, a montré la présence de l'humain, le mouton, le bœuf et le porc dans les eaux usées de la station d'Auteuil (A2) (Fig. 23). L'eau de rivière de l'Assomption As1 (niveau Repentigny) contenait l'ADN du bœuf, du porc et du poulet. L'eau de rivière des Mille-Îles (MI) au niveau de Rosemère contenait l'ADN de l'humain, du porc et du poulet. Les eaux usées de la station de Fabreville a montré des résultats dépendamment de l'échantillonnage. L'échantillon F2 contenait 4 espèces : l'humain, l'ovin, le bovin et le porcin. L'échantillon F3 contenait les cinq espèces.

Deux différences ont été remarquées avec les résultats obtenus dans le PCR interne (Tableau 14). Avec la technique de dot blot, les eaux usées de la station de Fabreville (F2) contenait l'espèce de porc tandis que le résultat de PCR interne n'a pas montré cela. L'eau de rivière de l'Assomption (niveau Repentigny) contenait l'ADN de porc ce qui n'a pas été révélé avec le PCR interne.

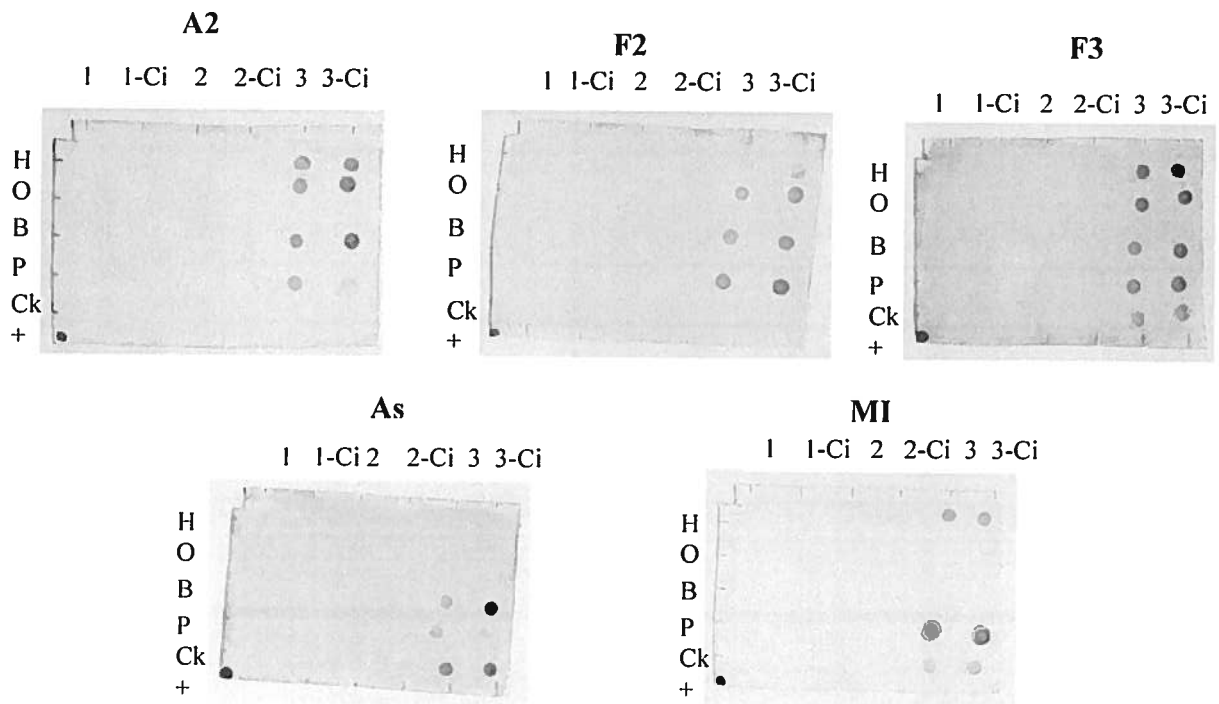


Figure 23 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir de l'ADN extrait de différents échantillons d'eaux A2, F2, F3, As1 et MI et les amorces Umito 3. **A2)** second échantillonnage des eaux usées d'Auteuil. **F2)** second échantillonnage des eaux usées de la station d'épuration de Fabreville. **F3)** troisième échantillonnage des eaux usées de la station d'épuration de Fabreville. **As1)** rivière l'Assomption. **MI)** rivière des Mille-îles. Voir figure 15 pour le gabarit des membranes. (+) : test positif. Durée de révélation = 16 heures.

Tableau 14 : Analyse comparative entre le PCR interne et le dot blot réalisée avec la sonde contenant la paire d'amorces Umito3 et l'ADN extrait de certains échantillons.

Espèces	Auteuil A1		Fabreville F2		Fabreville F3		Assomption As		Mille-Îles MI	
	DB	PCRi	DB	PCRi	DB	PCRi	DB	PCRi	DB	PCRi
Humain	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Ovin	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Bovin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Porcin	+	+	(+)	-	+	+	(+)	-	+	+
Poulet	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+ = présence de l'espèce; - = absence de l'espèce.

(+) = différence entre le résultat de PCR interne et le résultat de dot blot (DB).

3.14.5 Rivière de Mille-Îles

Aucune hybridation n'a été observée avec l'échantillon de rivière de Mille-Îles au niveau de Sainte Rose avec les 4 sondes (Fig. 24). Ce résultat a confirmé les résultats obtenus avec le PCR interne appliqué sur l'eau de la rivière des Mille-Îles (Tableau 3, échantillons R1 et R2).

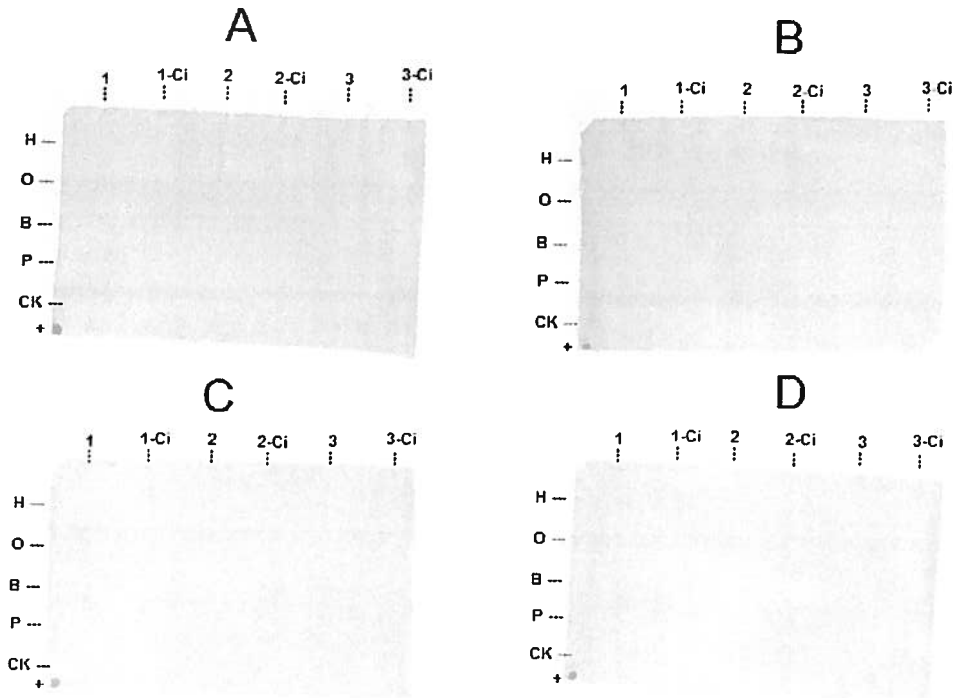


Figure 24 : Hybridation ADN/ADN entre les 30 oligonucléotides spécifiques fixés sur chaque membrane et les sondes préparées à partir de l'ADN extrait de l'eau de rivière de Mille-Îles au niveau de Sainte Rose. Les régions représentées par les sondes étaient : **A)** Umito 1, **B)** Umito 2, **C)** Umito 2' et **D)** Umito 3. Voir figure 15 pour le gabarit des membranes. (+) : test positif. Durée de révélation = 16 heures.

CHAPITRE 4: DISCUSSION

4.1 Choix des amorces spécifiques

Comme les amplifications prévues étaient de type PCR simple et PCR interne, il a été important de développer des amorces spécifiques à chacune des cinq espèces. Des séquences spécifiques d'ADN mitochondrial ont été utilisées pour élaborer ces amorces. Il a aussi été important de développer des amorces avec des températures d'appariement le plus possible semblables, tout en respectant la longueur idéale des amorces et la concentration en GC. Idéalement, le contenu en GC devrait être entre 35% et 60% et la longueur des amorces devait être comprise entre 18 pb et 30 pb (Elnifro *et al.*, 2000; Calvo *et al.*, 2002).

Cette étude a respecté ces normes : toutes les amorces présentes dans le Tableau 1 présentaient une longueur située entre 18 et 24 pb et un pourcentage en GC variant entre 45% et 55%. Les résultats obtenus après les diverses amplifications prouvent que le choix des amorces spécifiques simples et internes était judicieux et que chaque paire d'amorces spécifiques, ciblant l'ADN mitochondrial, n'a généré qu'une seule bande ayant la longueur attendue en présence de l'ADN total extrait de l'espèce correspondante.

4.2 Choix des rivières

Deux rivières ont été choisies pour appliquer cette méthode moléculaire qui visait à identifier et différencier les espèces à l'origine de la contamination fécale dans l'eau : la rivière des Mille-Îles et la rivière l'Assomption. Ces rivières ne sont pas loin de la ville de Montréal (voir Annexe 2). La rivière l'Assomption contient beaucoup de sédiments en suspension. Elle fait face à de graves problèmes causés par la pollution agricole diffuse provenant des méga-porcherie et par les effluents municipaux non traités de la ville de Joliette (Payment *et al.*, 1988; Saint-Laurent Vision 2000, 2002). 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). À noter que les prélèvements ont été faits à des jours différents et des heures différentes pour prendre en considération la quantité des rejets des secteurs résidentiels, qui a lieu avant l'heure de midi. En outre, une

étude faite à cet endroit par Payment *et al.* (1998) a mesuré et conclu la présence de virus entériques humains, et de réovirus.

Quant à la rivière des Mille-Îles, elle subit l'effet de plusieurs formes de pollution et la dégradation de sa qualité de l'eau est principalement due aux rejets urbains (Babineau *et al.*, 1998). Payment (2006) a observé que les microorganismes pathogènes étaient présents en nombre relativement élevé partout dans la rivière des Mille-Îles. D'autres études ont aussi remarqué que les eaux de la rivière des Mille-Îles sont généralement impropres à la baignade, par temps sec comme par temps de pluie (Environnement Québec, 2004).

Au cours des dernières années, d'importants volumes d'eaux usées ont été rejetés dans la rivière des Mille-Îles, sans aucun traitement préalable ou après un traitement partiel. De plus, dans certaines circonstances, tel qu'un dysfonctionnement d'équipements, des eaux usées ont été rejetées sans avoir subi toutes les étapes de traitement, notamment la désinfection. Donc, les différentes formes de pollution ont dégradé de façon significative la qualité de l'eau de la rivière des Mille-Îles (Babineau *et al.*, 1998). Par exemple, en 2005, il y a eu des déversements d'eaux usées non traitées ou non désinfectées dans l'eau de la rivière des Mille-Îles causés par divers problèmes; à St-Eustache, à l'entrée de la station d'épuration en raison de problèmes avec les filtres; à Auteuil, secteur Sainte-Rose, en raison d'un bris majeur du système de désinfection aux UV; dans le secteur Fabreville et à Rosemère-Lorraine, en raison de surcharges hydrauliques (Environnement Québec, 2007). Dans cette rivière, l'échantillonnage a été fait au niveau du parc des Mille-Îles où la couleur de l'eau était sombre et présentait de sédiments en suspension. Cet endroit est considéré comme un milieu récréotouristique.

4.3 Amplification de l'ADN mitochondrial dans l'eau des rivières

Les séquences cibles d'ADN mitochondrial présentes dans chacune des deux rivières (Mille-Îles et l'Assomption) ont été amplifiées par PCR simple puis par PCR interne. Cette deuxième amplification a pour avantage d'augmenter la sensibilité et la spécificité. En plus de l'ADN mitochondrial de l'humain et du poulet dans l'eau de la rivière des Mille-Îles, le PCR interne a permis de révéler la présence de l'ADN mitochondrial du porc. Par la suite, l'application de la technique dot blot a aussi confirmé ces résultats. La rivière des Mille Îles est une des voies que prend la Rivière des Outaouais au sud-ouest du Québec. Plusieurs

municipalités bordent cette rivière, telles que la municipalité de Deux-Montagnes, de St-Eustache, de Boibriand, d'Auteuil, de Ste-Thérèse, de Blainville, de Rosemère et de Terrebonne. Il aurait donc très bien pu y avoir présence de contamination humaine due aux rejets d'eaux usées parfois non traitées ou aux surverses et aux débordements d'égouts lors d'orage. De plus, la date du prélèvement (le 23 août), temps où plusieurs espèces d'oiseaux sont présentes sur la rivière, peut être une des causes de la contamination par une espèce d'oiseau (ou espèce de poulet). Par exemple, en se basant sur les empreintes génétiques et la résistance aux antibiotiques et en utilisant le REP-PCR, Edge *et al.*, (2005) ont lié la présence de *E. coli* dans les eaux urbaines de Toronto, sur le lac Ontario à une contamination fécale liée aux oiseaux. Plus de 6000 souches de *E. coli* ont été identifiées des eaux de plages, du sable et des eaux usées. Leurs résultats ont montré que les oiseaux étaient responsables en grande partie de la contamination fécale dans ce milieu. Edge *et al.* (2005) ont lié cette contamination à la présence d'un grand nombre de goélands et d'oies sur ces plages.

La rivière l'Assomption souffre de problèmes causés par la pollution agricole diffuse telle la présence de fermes d'élevage aux alentours. Les échantillons ont été pris en été (26 juillet 2006). L'un des échantillons provenait du nord de la rivière (à l'angle des rues du Bas Assomption Nord et rue Godfrint) et l'autre au sud de la rivière (à l'angle des rues Notre Dame et Archambault). En bordure de la rivière, il y a des fermes d'élevage pouvant expliquer la présence des ADN mitochondriaux de bœuf et de poulet détectés par amplification PCR et la présence des ADN mitochondriaux de porc détectés par la technique de dot blot. Nos résultats correspondent 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, et 20% sont des volailles. L'analyse de l'échantillon pris de la rivière des Milles-Îles, au niveau de Sainte Rose n'a révélé aucune des espèces suggérant une absence de contamination fécale récente.

4.5 Amplification de l'ADN mitochondrial dans les eaux usées

L'ADN mitochondrial humain, ovin, bovin et porcin ont été détecté dans l'affluent de la station d'épuration d'Auteuil. La présence d'ADN humain est attendue dans telles stations traitant les eaux usées. Par contre, la présence d'ADN de mouton, de bœuf et de porc est

inattendue et surprenante. En effet, la station d'Auteuil traite des eaux provenant des secteurs résidentiels, mais il est fort possible qu'elle reçoive parfois des rejets agricoles ou des déchets de certaines fermes d'élevages. Cela peut être le cas dans la station d'épuration de Fabreville. L'amplification PCR a montré la présence de trois espèces dans les deux premiers échantillonnages à Fabreville (F1 et F2) : l'humain, le mouton et le bœuf. Par la suite, le dot blot a détecté la présence du porc en plus des trois espèces déterminées par PCR. Au troisième échantillonnage (F3), il y a eu détection des cinq espèces en même temps. Lors de notre troisième échantillonnage (le 7 juin 2006), un employé de la station de Fabreville nous a mentionné qu'il y a eu un déversement d'une citerne d'origine inconnue. Il est fort possible que ce déversement contienne des résidus de viandes d'abattoirs ou des déchets animaux appartenant à l'espèce de porc et de poulet. Il est aussi possible qu'il s'agisse de résidus de viandes jetés dans le broyeur à déchets dont sont équipés les éviers de cuisine de certaines maisons. En plus, cela peut être expliqué par le fait que certaines traces d'ADN animal peuvent se retrouver dans les fèces humaines suite à la consommation de viande. En utilisant la technique de PCR multiplex en temps réel, Caldwell *et al.* (2007) ont rapporté que sur quatre volontaires ayant consommé de la viande de bœuf au cours des dernières 24 heures, des signaux résiduels de bœuf ont pu être détectés chez deux d'entre eux. Par contre, aucune trace d'ADN de porc n'a pu être trouvée dans les fèces des volontaires ayant mangé de la viande de cet animal.

4.6 Amplification de l'ADN mitochondrial en présence d'ADN bactérien

Les tests de sensibilité faits en amplifiant différentes quantités d'ADN avec et sans ADN bactérien (100 ng d'ADN bactérien) ont été semblables. Dans les deux conditions, les amplicons ont été observés jusqu'à une concentration de 50 pg d'ADN de l'espèce correspondante. La présence d'ADN bactérien n'a donc pas affecté les amplifications. Une grande quantité d'ADN total (jusqu'à 450 ng) a été requise lors des amplifications de l'ADN mitochondrial présents dans les eaux usées. Au delà de 450 ng d'ADN total, les amplifications n'ont pas fonctionné. Toutefois, les concentrations d'ADN utilisées dans toutes nos expériences étaient constamment inférieures à 450 ng. Donc, la présence d'ADN bactérien n'a pas affecté nos amplifications avec les concentrations d'ADN total utilisées. Selon Machiels *et al.* (2000), un excès d'ADN inhibe les réactions de PCR. Par exemple, le

pourcentage d'ADN humain dans les fèces humaines se situe habituellement entre 0.06% et 46% (Machiels *et al.*, 2000). Cette grande différence entre ces deux valeurs est due à l'abondance de la microflore intestinale présente dans les fèces humaines. Dans notre cas, l'inhibition de l'amplification PCR a eu lieu lorsque la concentration d'ADN total a été plus que 450 ng.

4.7 Détection et persistance de l'ADN après quelques mois

Comparé à l'ADN génomique, l'ADN mitochondrial est considéré résistant à cause de sa durée de vie assez longue, de sa petite taille, sa structure circulaire et sa protection dans la mitochondrie (Ingman *et al.*, 2000). Cependant, la stabilité de l'ADN mitochondrial peut tout de même être influencée par certaines conditions environnementales et la présence de DNase. Tous ces facteurs peuvent expliquer la persistance et la disparition de l'ADN mitochondrial dans certains des échantillons d'eaux usées ou d'eaux de rivières retestés après 7 à 9 mois de préservation à 4°C. Cela constitue un avantage pour cette méthode moléculaire, puisqu'elle est basée sur la détection de l'ADN mitochondrial dans l'eau. Cette grande stabilité peut être en même temps un désavantage puisque les résultats obtenus peuvent ne pas refléter une contamination récente, mais au moins, dans ce cas, cette dernière sera détectée.

4.8 Une méthode différente des méthodes traditionnelles

Cette méthode moléculaire, développée à l'INRS-Institut Armand-Frappier, a été la première à utiliser l'ADN mitochondrial comme marqueur génétique pour détecter l'espèce en cause d'une contamination fécale (Martellini *et al.*, 2005). Jusqu'à présent, et selon les publications, aucune méthode permettant de détecter une contamination fécale n'a pu identifier toutes les sources de contamination possible. Certaines détectent la présence de microorganismes indicateurs ou se basent sur la comparaison de profil génotypiques ou phénotypiques par rapport à des bases de données présentes dans certaines banques de référence (Edge et Schaefer, 2006). Ces méthodes sont limitées puisqu'elles peuvent seulement identifier les espèces répertoriées présentement dans les banques de données. Par exemple, celles qui reposent sur *E. coli* ont un taux de classification inexacte et nécessitent des banques de matériel de plus en plus importantes pour être capable de présenter toute la

diversité des isolats de *E. coli* résultant des différentes sources de contamination fécale (Griffith *et al.*, 2003). En plus, ces méthodes ne permettent pas de distinguer l'origine de la contamination fécale dans l'eau en identifiant l'espèce animale en cause. Par ailleurs, les méthodes sans banques de données de référence, comme celles se fondant sur les *Bacteroides* sp., exigent une évaluation plus poussée de la spécificité des hôtes et doivent être testées davantage sur le terrain (Stewart *et al.*, 2007).

Griffith *et al.* (2003) ont présenté les résultats obtenus par 22 laboratoires utilisant 12 méthodes différentes pour détecter la source d'une contamination fécale. Ces laboratoires ont reçu des échantillons d'eaux contaminées et chaque échantillon contenait une à trois des cinq possibilités de source de contamination fécale (humaine, de chien, de bœuf ou de goéland, ou d'eaux usées). Aucune méthode n'a permis d'identifier complètement toutes les sources de contamination fécale. Les méthodes utilisant les coliphages F+ ont pu identifier l'échantillon contaminé par les eaux usées. Les méthodes qui se sont appuyées sur la banque de données ont déterminé la source de contamination dominante mais il y avait beaucoup de faux positifs. Les méthodes fondées sur les génotypes avaient des résultats plus fiables que celles basées sur les phénotypes. Seule la méthode utilisant le PCR a pu différencier entre la source de contamination fécale humaine et non humaine. S'il y avait des amorces spécifiques aux espèces animales, la détection aurait pu être faite avec succès.

Certaines méthodes sont limitées et dépendantes. Les méthodes se basant sur l'amplification de marqueurs génétiques spécifiques à l'espèce peuvent identifier autant d'espèces que le permettent les amorces disponibles. Et grâce aux progrès rapides réalisés ces dernières années par les recherches biotechnologiques et les programmes informatiques, une grande disponibilité de séquences nucléiques appartenant à diverses espèces est disponible. Dans notre étude, seulement cinq espèces ont été ciblées, mais il serait possible d'augmenter le nombre d'espèces animales à détecter en générant de nouvelles amorces correspondantes.

4.9 Amélioration et optimisation de la méthode détectant l'ADN mitochondrial

Certaines modifications ont été faites pour rendre cette méthode moléculaire plus simple et rapide : le protocole d'échantillonnage a été simplifié en passant par une étape de filtration suivie d'une extraction rapide de l'ADN total par broyage avec des billes. Comparée à la centrifugation, étape utilisée préalablement (Martellini *et al.*, 2005), la

filtration est une méthode rapide pour concentrer la matière en suspension dans l'eau en 1 à 3 minutes maximum. Cette étape peut même être appliquée sur le terrain de l'échantillonnage si le matériel (filtre) est disponible. Le fait aussi que la membrane filtrante peut être directement enroulée et introduite dans un tube contenant le tampon de lyse et les billes et congelé, facilite la procédure. Quant à la sensibilité et l'exactitude de la méthode, l'élaboration des amorces spécifiques internes en plus des amorces simples a rendu l'amplification de l'ADN mitochondrial de chaque espèce très spécifique.

4.10 Limites et avantages de la méthode

Parmi les désavantages reliés à cette méthode, nous retrouvons que la détection d'ADN mitochondrial dans un échantillon d'eau de rivière n'est pas nécessairement liée à une contamination fécale. En fait, l'ADN mitochondrial pourrait aussi provenir de cadavres ou de carcasses d'animaux, de la peau d'animaux, de nageurs ou de morceaux de viandes. Une telle détection peut donner un aperçu de la présence d'une source de contamination dans le milieu. Cet inconvénient peut être considéré comme un avantage dans d'autres domaines de recherches, comme exemple dans les enquêtes policières qui utilisent les empreintes génétiques. Il n'est guère dangereux d'avoir de l'ADN mitochondrial dans notre eau, mais il est très dangereux si la source de cet ADN mitochondrial provient de cellules épithéliales du tractus intestinal, donc d'une contamination fécale.

La méthode a beaucoup plus d'avantages que de limites : elle est sensible, relativement rapide, exacte, fiable et efficace pour identifier une source de contamination fécale. Elle fait partie des approches indépendantes de la construction d'une banque de données. Cette méthode peut aussi être utilisée conjointement à d'autres méthodes pour certains outils de détection et ainsi pour former une trousse de dépistage très fiable.

4.11 Choix de la technique hybridation ADN-ADN ou dot blot

Puisque nous cherchons toujours à simplifier et à améliorer cette technique tout en gardant l'exactitude et la fiabilité des résultats, le fait d'appliquer un seul PCR capable de viser les 5 espèces en même temps, et cela en utilisant une seule paire d'amorces était idéal. Pour cela, il a été décidé d'élaborer des amorces universelles. Une attention particulière a du être accordée à la longueur des amorces (18 à 24 pb) et à leur contenu en G+C (45 à 55%).

Au lieu de faire des PCR multiplexes ou plusieurs PCR à la fois, la résolution des différentes séquences d'ADN mitochondrial dans le produit de PCR (la sonde) a été faite par hybridation sur une membrane contenant des oligonucléotides spécifiques aux espèces ciblées. C'est la technique de dot blot.

Le dot blot est une méthode qui présente l'intérêt d'être sensible, simple et rapide (Jung et Chae, 2005 ; Cho *et al.* 2002). Cette technique couplée au PCR peut augmenter les chances de détection (Call *et al.*, 2003). Certaines études soulignent toutefois que le dot blot manque de spécificité (faux positifs) (Johnson, 1995). Mais dans notre projet, en présence des oligonucléotides bien spécifiques à chaque espèce et en testant ces oligonucléotides avec des sondes contenant l'ADN spécifique à chaque espèce, les résultats ont été très spécifiques et reproductibles.

4.12 Choix des sondes

Il a été nécessaire d'optimiser cette technique et de tester les sondes avec des ADN spécifiques avant d'analyser les échantillons d'eaux. Pour ce faire, chacune des quatre paires d'amorces universelles a été testée sur l'ADN extrait de chaque espèce (humain, mouton, bœuf, porc et poulet). Les vingt amplicons marqués au DIG ont été hybridés séparément sur les membranes dot blot dans le but d'évaluer les conditions d'hybridation pour éviter les réactions croisées avant toute analyse sur les échantillons d'eaux. Certains facteurs influencent aussi le comportement d'une sonde : la température de dénaturation de l'ADN, soit température au-delà de laquelle l'ADN passe sous forme simple brin, la composition en bases (G et C), la longueur des fragments et la stringence du milieu (Jung et Chae, 2005; Cho *et al.* 2002). En effet, les sondes ont été chauffées avant l'hybridation pour dénaturer celles-ci. La dénaturation est liée à la rupture des liaisons hydrogène reliant chaque paire de bases (Lodish, *et al.*, 1995). La température de dénaturation augmente avec le nombre de paires de bases GC qui sont reliées par trois liaisons hydrogène (au lieu de deux dans la paire AT). Si un refroidissement brutal a lieu dans la solution d'ADN dénaturée, la structure monocaténaire est conservée. Par contre, si le refroidissement est lent, il se produit une renaturation de l'ADN : les deux brins de l'ADN monocaténaire se réassocient pour reformer une double hélice (Watson *et al.*, 1994) .

4.13 Choix des oligonucléotides

Une des étapes importantes pour réaliser un dot blot a été la conception des oligonucléotides. Les propriétés thermodynamiques des oligonucléotides influencent la sensibilité, la spécificité, l'ubiquité et la rapidité de l'hybridation (Wang *et al.*, 2002 ; Matveeva *et al.*, 2003). La longueur des oligonucléotides est aussi un facteur à considérer. Un oligonucléotide long permettra une meilleure sensibilité et spécificité qu'un oligonucléotide court. Religio *et al.* (2002) ont montré qu'une séquence nucléique de 30 ou de 35 nucléotides était de 2 à 2,5 fois plus sensible qu'une séquence de 25 nucléotides. D'autre part, un oligonucléotide trop court va plus facilement s'hybrider à des cibles non-spécifiques (Religio *et al.*, 2002). Les oligonucléotides utilisés dans cette étude, avaient 50 à 57 nucléotides. Dans les conditions optimales d'hybridation, deux brins d'ADN doivent posséder au moins 80 % de séquences complémentaires pour pouvoir se réassocier (Watson *et al.*, 1994).

Il a été important d'élaborer des oligonucléotides spécifiques à chacune des espèces et de les fixer sur la membrane de nylon. Tous les oligonucléotides choisis étaient spécifiques : l'absence de réactions croisées dans les deux premières heures de révélation entre les espèces dans toutes les régions a bien démontré cela. Toutefois, une faible réaction croisée est apparue après 16 heures de révélation entre le boeuf et le porc dans la région 2 et la région 3, limitées respectivement par les amorces universelles Umito-2 et Umito-3. Cette faible réaction croisée représentée par une très faible intensité de la couleur du spot est apparue aussi dans la région 3 avec les oligonucléotides de l'humain, du mouton et du poulet. Il est donc recommandé de révéler seulement quelques heures pour éviter ces hybridations croisées et d'effectuer des lavages plus stringents.

4.14 Facteurs influençant l'hybridation

Plusieurs essais ont été faits pour optimiser l'expérience de dot blot dans notre étude. Ces essais ont montré que la technique peut être influencée par certains facteurs : [1] une préhybridation peut améliorer nettement le rapport signal sur bruit de fond. Il suffit de pré-incuber les membranes avec le tampon d'hybridation sans sonde. Ce tampon contient de l'ADN de poisson, qui va saturer les sites de fixation non spécifiques. [2] Il est important de respecter les étapes de lavage : généralement un lavage est composé de plusieurs bains

successifs de durées variables, réalisé dans des solutions à températures et à salinités différentes (Religio *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2002). L'ordre des étapes de lavage aide à éliminer l'excès de sondes non fixées et par la suite les sondes fixées non spécifiquement. Le lavage le plus stringent prévient ainsi les hybridations croisées (Soule *et al.*, 2006).

4.15 Comparaison des résultats du PCR avec les résultats du dot blot

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 un plus grand nombre d'espèces que d'autres. Nos travaux pourraient mener à créer une nouvelle trousse de dépistage, basée sur les amplifications PCR et de dot blot. D'après Lingappa *et al.*, (2002), l'électrophorèse sur un gel d'agarose et la détection au bromure d'éthidium ne semble pas être assez sensible pour visualiser une petite quantité d'ADN amplifié. Cependant, la technique de dot blot utilisée pour détecter un produit PCR montre une sensibilité 10 fois plus élevée que l'électrophorèse sur un gel d'agarose.

Jung et Chae (2004) ont comparé les résultats obtenus sur une membrane par dot blot avec les résultats obtenus sur un gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium suite à un RT - PCR. Dans leur étude, le dot blot a détecté la présence du virus entérique (PEDV) dans la matière fécale. Par contre, ce résultat était négatif en regardant le gel d'agarose (absence de bande). Dans notre étude, et dans certains échantillons, le dot blot a été plus sensible que le PCR interne. Cette approche a permis la détection de l'ADN mitochondrial du porc dans les échantillons d'eaux usées provenant de Fabreville (premier échantillonnage, F1), et de la rivière l'Assomption (As). Ces deux résultats positifs n'ont pas été visualisés en révélant le gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium suite à un PCR interne.

4.16 Limite et qualité du dot blot

La technique de dot blot présentait plusieurs avantages pour notre étude: son utilisation a permis de comparer les résultats obtenus par PCR simple et PCR interne, de confirmer les détections trouvées positives pour certaines espèces dans les échantillons d'eau et de révéler des résultats que le PCR n'a pu révéler. Cette technique était simple à mettre en œuvre, très reproductible et rapide pour dépister plusieurs espèces en même temps. Le temps de révélation rapide, typiquement de l'ordre de quelques heures, a permis de visualiser

directement les résultats. Il s'agit donc d'une méthode novatrice sur laquelle il faudra se fonder pour détecter la ou les espèces à l'origine d'une contamination fécale.

4.17 Durée de vie de la cible

Il sera intéressant de connaître la durée de vie d'une cible. Par exemple, les bifidobactéries ne peuvent pas être cultivées si elles ont passées plus de cinq heures dans l'eau douce ou plus de 10 heures dans l'eau salée (Bernhard et Field, 2000). L'ADN a une durée de vie plus longue que les bactéries puisqu'à la mort de ces dernières, l'ADN est relargué et peut être détecté. Celui de *Bifidobacterium* peut persister de quelques jours à deux semaines (Bernhard et Field, 2000). Martellini *et al.* (2005) ont montré que l'ADN mitochondrial des animaux ciblés résiste environ cinq jours à température de la pièce. Nous avons démontré que l'ADN mitochondrial peut être détecté après plusieurs mois à 4°C. Cela signifie que la durée de vie de notre cible est plus longue que la durée de vie d'autres cibles utilisées dans d'autres études. Dans ce cas, même si la détection de l'ADN mitochondrial ne peut pas indiquer si la contamination est très récente, un marqueur qui persiste plus longtemps permet de ne pas manquer un événement de contamination.

4.18 Temps d'exécution

Pour faire face aux problèmes de contamination de l'eau à plus grande échelle, il faut une méthode efficace, fiable, durable et applicable. Les méthodes qui se réfèrent à une banque de données pour identifier une cible sont plus lentes que celles qui sont indépendantes des comparaisons présentes dans la banque de données (Edge et Schaefer, 2006; Stewart *et al.*, 2007). Aussi, les méthodes basées sur les banques de références ont été les plus largement utilisées, bien que l'élaboration de ces banques puisse demander beaucoup de travail et de temps. Même les méthodes qui utilisent des marqueurs chimiques, comme les stérols, la caféine et les détergents prennent du temps à effectuer. Les applications qui produisent des résultats rapides sont les méthodes moléculaires n'ayant pas besoin de banques de données. Notre méthode est capable de produire des résultats en moins de 12 heures.

4.19 Coût

Les méthodes traditionnelles nécessitent beaucoup de travail tant pour la détection que pour l'identification. De plus, la succession de différentes étapes et leur non automatisation est très coûteuse et ne fournit que des données semi quantitatives. Le recours aux outils de la biologie moléculaire permettrait de simplifier les manipulations, de les automatiser et de les standardiser. Cela permettrait donc de faire de sérieuses économies. Enfin, l'évolution des techniques permettrait d'augmenter la sensibilité (Stewart *et al.*, 2007).

4.20 Perspectives

Nos travaux proposent diverses voies de recherche. Premièrement, il reste à parfaire l'optimisation du dot blot afin d'améliorer la sensibilité, la rapidité, la quantification et l'efficacité de la détection. Du dot blot, il y aura le passage à une méthode voisine qui sera les puces à ADN ou «DNA microarray». La technologie des puces à ADN connaît à l'heure actuelle un essor exceptionnel et suscite un formidable intérêt dans la communauté scientifique. Grâce à cette technique, la mesure simultanée du niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes voire d'un génome entier dans des dizaines de conditions différentes, physiologiques ou pathologiques est techniquement possible. Donc, il sera important de détecter le plus possible d'espèces en élaborant une grande quantité d'oligonucléotides spécifiques. Les prochains oligonucléotides pourraient cibler l'ADN mitochondrial des animaux domestiques, les animaux sauvages, les animaux présent dans les élevages au Canada et les animaux d'autres pays intéressés à adopter cette méthode. Il sera important de tester la spécificité de cette trousse d'oligonucléotides avant l'application des puces à ADN.

Il serait intéressant de développer un réseau international de recherches qui partage les diverses méthodes et applications, que se soient les méthodes moléculaires ou les méthodes microbiologiques. Il serait aussi intéressant d'avoir davantage de comparaisons interlaboratoires des méthodes. L'utilisation de diverses méthodes moléculaires et bactériologiques améliorera certainement la détection d'une contamination fécale. Il serait pertinent de jumeler plusieurs indicateurs de contamination fécale; par exemple, l'ADN mitochondrial, les coliformes et les bactériophages pour avoir une méthode qui satisfera le mieux les critères d'exactitudes, de sensibilité et de reproductibilité.

Finalement, il serait possible d'appliquer notre méthode moléculaire dans d'autres domaines comme en médecine légale et dans les enquêtes policières pour détecter la présence de l'espèce humaine ou de tissus appartenant à cette espèce.

CONCLUSION

Nettoyer les eaux usées afin de limiter au maximum la pollution de nos réserves en eau issues des lacs, rivières et nappes souterraines sera un objectif important pour la santé publique. Préserver les ressources en eau équivaut à préserver le patrimoine naturel et la qualité de la vie.

L'objectif de cette étude était de développer une méthode permettant de détecter l'espèce responsable d'une contamination fécale. Jusqu'à présent, aucune des méthodes n'a été parfaite pour dépister une contamination fécale. Cette méthode était la première à utiliser l'ADN mitochondrial pour détecter l'espèce à l'origine d'une contamination fécale (Martellini *et al.*, 2005). Il a donc fallu concevoir de nouvelles amorces spécifiques des cinq espèces ciblées par cette étude. Par la suite, comme dans toutes les méthodes, il a été nécessaire de vérifier et d'améliorer plusieurs paramètres : simplifier l'étape de concentration de la matière dissoute dans l'eau, effectuer une extraction rapide d'ADN total, examiner la spécificité de ces amorces, la sensibilité du PCR et la capacité de détecter l'ADN mitochondrial dans les échantillons d'eau usée et d'eau de rivière.

Cette méthode a réussi à amplifier l'ADN mitochondrial des cinq espèces. Les diverses expériences menées au cours de ce projet ont permis de démontrer l'efficacité et la sensibilité du PCR interne qui a été capable de viser des espèces non détectées par le PCR simple. En outre, l'ADN mitochondrial a été détecté avec succès dans les échantillons d'eaux usées et d'eau de rivières polluées.

Ensuite, la méthode a été améliorée en appliquant la technique dot blot ou hybridation ADN-ADN pour viser toutes les espèces en même temps. Il a donc fallu élaborer des amorces universelles capables d'amplifier toutes les espèces et de concevoir des oligonucléotides spécifiques à chaque espèce. Divers éléments ont été vérifiés : la spécificité des oligonucléotides, la sensibilité du PCR avec les amorces universelles, et les conditions d'hybridation adéquates comme les étapes de lavages et la température d'hybridation à 55°C. Selon les résultats obtenus, le dot blot s'avère être une technique sensible, rapide, efficace et spécifique puisqu'il a pu discriminer d'une part, les espèces polluantes des échantillons d'eaux, et d'autre part, les espèces non visées par le PCR interne.

Ces résultats sont encourageants, et cette méthode novatrice montre qu'elle est simple, efficace, reproductible, sensible et fiable pour être utilisée afin de différencier les sources de contamination fécale dans l'eau.

REFERENCES

- BABINEAU, D., W. SMORAGIEWICZ et P. PAYMENT. 1998. «La qualité de l'eau de la rivière des Milles-Iles». Vecteur Environ, vol. 31, no. 4, p. 33-39.
- BANDALETOVA, T., N. BAILEY, S. A. BINGHAM et A. LOKTIONOV. 2002. « Isolation of exfoliated colonocytes from human stool as new technique for colonic cytology». APMIC, vol. 110, no. 3, p. 239-246.
- 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.
- 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.
- BIAVATI, B., M. VESCOVO, S. TORRIANI et V. BOTTAZZI. 2000. «Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications». Ann Microbiol, vol. 50, no.2, p. 117-131.
- BITTON, G. 1999. «Wastewater microbiology ». Wiley-Liss, 2^{ème} édition, 578 p
- CALDWELL, J. M., M. E. RALEY et J. F. LEVINE. 2007. «Mitochondrial Multiplex Real-Time PCR as a Source Tracking Method in Fecal-Contaminated Effluents». Environ Sci Technol, vol. 41, no. 9, p. 3277 -3283.
- CALL, D. R., M. K. BORUCKI et F. J. LODGE. 2003. «Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays». J Microbiological Methods, vol. 53, no. 2, p. 235-243.

CALVO, J. H., C. RODELLAR, P. ZARAGOZA et R. OSTA. 2002. «Beef and bovine derived material identification in processed and unprocessed food and feed by PCR amplification». J Agric Food Chem, vol. 50, no. 19, p. 5262-5264.

CAMPAGNOLO, E. R., K. R. JOHNSON, A. KARPATI, C. S. RUBIN, D. W. KOLPIN, M. T. MEYER, J. E. ESTEBAN, R. W. CURRIER, K. SMITH, K. M. THUG, et M. MCGEEHIN. 2002. «Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations». Sci Total Environ, vol. 299, no. 1-3, p. 89-95.

CAN., J., D. SPIEGELMAN, G. WHISSELL et C. W. CREER. 2005. «A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities». Microbiol, vol. 51, no. 5, p. 355-386.

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.

CHANDLER, D. P., G. J. NEWTON, J. A. SMALL et D. S. DALY. 2003. «Sequence versus structure for the direct detection of 16S rRNA on planar oligonucleotide microarrays». Appl Environ Microbiol, vol. 69, no. 5, p. 2950-2958.

CHEN, W., G. MARTINEZ et A. MULCHANDANI. 2000. «Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting Salmonella». Anal Biochem, vol. 280, no. 1, p. 166-172.

CHO, W. S., C. CHOI et C. CHAE. 2002. «In situ hybridization for the detection of the apxIV gene in the lungs of pigs experimentally infected with twelve Actinobacillus pleuropneumoniae serotypes». Vet Res, vol. 33, no. 6, p. 653-660.

CLESCERI, L. S., A. E. GREENBERG et A. D. EATON. 1998. «Standard methods for the examination of water and waste water». Éd.18, A.P.H.A, Washington.

- DELCENSERIE V., N. BECHOUX, T. LEONARD, B. CHINA et G. DAUBE. 2004. «Discrimination between Bifidobacterium species from human and animal origin by PCR-Restriction fragment length polymorphism». J Food Prot, vol. 67, no. 6, p. 1284-1288.
- DELCENSERIE V., N. BECHOUX, B. CHINA, G. DAUBE et F. GAVINI. 2005. «A PCR method for detection of bifidobacteria in raw milk and raw milk cheese: comparison with culture-based methods». J Microbiol Methods, vol. 61, no. 1, p. 55-67.
- EDBERG, S.C., M.J. ALLEN et D.B. SMITH. 1989. «National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and Escherichia coli from drinking water: comparison with presence-absence techniques». Appl Environ Microbiol, vol. 55, no.4, p. 1003-1008.
- EDGE, T. A., et K. A. SCHAEFER. 2006. «Le dépistage des sources de pollution microbienne dans les écosystèmes aquatiques: état de la science et évaluations des besoins». Institut national de recherches sur les eaux, Burlington (Ontario). Série de rapports d'évaluation scientifique de l'INRE, et série d'ateliers sur les sciences de l'eau et les politiques.
- EDGE, T. et S. HILL. 2005. «Occurrence of antibiotic resistance in Escherichia coli from surface waters and fecal pollution sources near Hamilton, Ontario». Can J Microbiol, vol. 51, no. 6, p. 501-505.
- ELHMMALI, M., D. ROBERS et R. EVERSLED. 2002. «Combined analysis of bile acids and sterols/stanols from riverine particulates to assess sewage discharges and other fecal sources ». Environ Sci Technol, vol. 34, no. 1, p. 39-46.
- 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 QUÉBEC. 2007. «Qualité de l'eau de la rivière des Mille-Îles 2000-2005». Gouvernement du Québec.
- ENVIRONNEMENT QUÉBEC. 2004. «Caractérisation de l'eau souterraine dans les sept bassins versants». Gouvernement du Québec.
- ENVIRONNEMENT QUÉBEC. 2003. «Bassin versant de la rivière l'assomption (1997)- Modifier nos pratiques agricoles... la priorité». Gouvernement du Québec.
- FLINT, S. J., L. W. ENQUIST, V. R. RACANIELLO, A. M. SKALKA. 2000. «Principles of virology». 2^{ième} édition. ASM Press, 918 p.
- FORTIN, N. Y., A. MULCHANDANI et W. CHEN. 2001. «Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of Escherichia coli O157:H7». Anal Biochem, vol. 289, no. 2, p. 281-288.
- GARRIDO, P., M. BLANCO, M. MORENO-PAZ, C. BRIONES, G. DAHBI, J. BLANCO et V. PARRO. 2006. «oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and enteropathogenic E. coli (EPEC) strains. Clin Chem, vol. 52, no. 2, p.192-201.
- GAVINI F., M. VAN ESBROECK, J. P. TOUZEL, A. FOURMENT et H. GOOSSENS. 1996. «Detection of Fructose-6-phosphate Phosphoketolase (F6PPK), a Key Enzyme of the Bifid-Shunt, in Gardnerella vaginalis». Anaerobe, vol. 2, no. 3, p. 191-193.
- GLASSMEYER, S. T., E. T. FURLONG, D. W. KOLPIN, J. D. CAHILL, S. D. ZAUGG, S. L. WERNER, M. T. MEYER et D. D. KRYAK. 2005. «Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination ». Environ Sci Technol, vol. 39, no. 14, p. 5157-5169.

- GRIFFITH, J. F., S. B. WEISBURG 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.
- HA, H., et M. K. STENSTROM. 2000. «Methods to identify human and animal fecal pollution in water: a review (draft 3)».
www.seas.ucla.edu/stenstro
- 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 fecal pollution in water ». J. Appl. Microbiol, vol. 94, no.5, p. 792-799.
- HARWOOD, V. J. 2007. «Assumptions and limitations associated with Microbial Source Tracking Methods». Ch. 2 dans: «Microbial source tracking». SANTO DOMINGO. J et M. S. SADOWSKY (eds). ASM Press, Wahington, 285 p.
- 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.
- HAMELIN, K., G. BRUANT, A. EL-SHAARAWI, S. HILL, T. A. EDGE, J. FAIRBROTHER, J. HAREL, C. MAYNARD, L. MASSON et R. BROUSSEAU. 2007. «Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in Escherichia coli isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas». Appl Environ Microbiol, vol. 73, no. 2, p. 477-484.
- HERSHFIELD, B., G. CHADER et G. AGUIRRE. 1994. «A polymerase chain reaction-based method for the identification of DNA samples from common vertebrate species». Electrophoresis, vol. 15, no. 7, p. 880-884.

- HOT D., O. LEGEAY, J. JACQUES, C. GANTZER, Y. CAUDRELIER, K. GUYARD, M. LANGE et L. ANDREOLETTI. 2003. «Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water». Water Research, vol. 37, no. 19, p. 4703-4710.
- HURST, C. J., R. L. CRAWFORD, J. L. GARLAND, D. A. LIPSON, A. L. MILLS et L. D. STENZENBACH. 2007. «Manual of environmental microbiology». 3^{ème} éd, ASM, Washington.
- INGMAN, M., H. KAESSMANN, S. PÄÄBO et U. GYLLENSTEN. 2000. «Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans». Nature, vol. 408, no. 6, p. 708-713.
- ISOLAURI E., P. V. KIRJAVAINEN et S. SALMINEN. 2002. «Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? ». Gut, vol. 50, no. 3, p. 54-59.
- JIME'NEZ-CLAVERO, M. A., C. FERNA'NDEZ, J. A. ORTIZ, J. PRO, G. N. CARBONELL, J. V. TARAZONA, N. ROBLAS et V. LEY1. 2003. «Teschoviruses as Indicators of Porcine Fecal Contamination of Surface Water». Applied And Environmental Microbiology, vol. 69, no. 10, p. 6311–6315.
- JOHNSON, K. 1995. «Periodic health examination, 1995 update: Screening for human papillomavirus infection in asymptomatic women». Canadian Medical Association Journal, vol. 152, no.4, p. 483-493.
- JOHNSON, L. K., M. B. BROWN, E. A. CARRUTHERS, J. A. FERGUSON, P.E. DOMBEK et M.J. SADOWSKY. 2004. «Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of Escherichia coli from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution». Appl Environ Microbiol, vol. 70, no. 8, p. 4478-4485.

- JUNG, K et C. CHAE. 2005. «RT-PCR-based dot blot hybridization for the detection and differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in fecal samples using a non-radioactive digoxigenin cDNA probe». Journal of Virological Methods, vol. 123, no. 2, p. 141-146.
- 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.
- KLEIN G., A. PACK, C. BONAPARTE et G. REUTER. 1998. «Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria». Int J Food Microbiol, vol, 41, no.2, p. 103-125.
- KO, G., T. L. CROMEANS et M. D. SOBSEY. 2003. «Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR». Appl Environ Microbiol, vol. 69, no. 12, p. 7377-7384.
- LAHIFF, S., M. GLENNON, L. OBRIEN, 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.
- LEUNG, K. T., R. MACKERETH, Y-C. TIEN et E. TOPP. 2004. «A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources ». FEMS Microbiol Ecol, vol. 47, no. 1, p. 111-119.
- LEY, A. N., R. J. BOWERS et S. WOLFE. 1988. «Indoxyl- β -D-glucuronide, a novel chromogenic reagent for the specific detection and enumeration of *Escherichia coli* in environmental samples». Rev Can Microbiol, vol. 34, no.5, p. 690-693.
- LI, F. et G. D. STORMO. 2001. «Selection of optimal DNA oligos for gene expression arrays». Bioinformatics, vol. 17, no. 11, p. 1067-1076.

- LINGAPPA, J. R., W. LAWRENCE, S. WEST-KEEFE, R. GAUTOM et B. T. COOKSON. 2002. «Diagnosis of community-acquired pertussis infection: comparison of both culture and fluorescent-antibody assays with PCR detection using electrophoresis or dot blot hybridization». J Clin Microbiol, vol. 40, no. 8, p. 2908-2912.
- LODISH, BALTIMORE, BERK, ZIPURSKY, MATSUDAIRA et DARNELL. 1995. «Biologie moléculaire de la cellule». 3^{ième} édition. De Boeck Université, 1345 p.
- LUCENA F., X. MENDEZ, A. MORON, E. CALDERON, C. CAMPOS, A. GUERRERO, M. CARDENAS, C. GANTZER, L. SCHWARTZBROD, S. SKRABER et J. JOFRE. 2003. «Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America». J Appl Microbiol, vol. 94, no. 5, p. 808-815.
- MACHIELS, B. M., T. REURS, M. LINDHOUT, K. HARDY, T. HLAVATY, D. D. BANG, V. A. SOMERS, C. BAETEN, M. VON MEYENFELFT et F. B. THUNNISSEN. 2000. «New protocol for DNA extraction of stool». Biotechniques, vol. 28, no. 2, p. 286-290.
- MANGIN I., Y. BOUHNİK, N. BISETTI et B. DESCARIS. 1999. «Molecular monitoring of human intestinal Bifidobacterium strain diversity». Res Microbiol, vol. 150, no. 5, p. 343-350.
- MARTELLINI, A., P. PAYMENT et R. VILLEMUR. 2005. « Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water ». Water Res, vol. 39, no. 4, p. 541-548.
- MATVEEVA, O. V., S. A. SHABALINA, V.A. NEMTSOV, A. D. TSODIKOV, R. F. GESTELAND et J. F. ATKINS. 2003. «Thermodynamic calculations and statistical correlations for oligo-probes design». Nucleic Acids Res, vol. 31, no. 14, p. 4211-4217.

- MOORE, W. E. C., et L. V. HOLDEMAN. 1974. «Human faecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians». Applied Microbiology, vol. 27, no. 1-2, p. 961-979.
- OCED. 2003. G.J. MEDEMA, G. J., P. PAYMENT, A. DUFOUR, W. ROBERTSON, M. WAITE, P. HUNTER, R. KIRBY et Y. ANDERSON. Chap.1: «Safe drinking water: an ongoing challenge».
- PAYMENT, P., 2006. «Enlèvement des micro-organismes pathogènes et des bactéries indicatrices par les stations de traitement des eaux usées municipales situées sur la rivière des Mille Îles». Vecteur Environnement, vol. 39, no. 2, p. 60-72.
- PAYMENT, P. 2001. «Cultivation of viruses from environmental samples». Dans: «Manual of environmental microbiology». 2^{ème} éd, sous la direction de C. J. HURST, R. L. CRAWFORD, G. R. KNUDSEN, M. J. MCINERNEY et L. D. STENZENBACH. ASM, Washington.
- PAYMENT, P., F. AFFOYON et M. TRUDEL. 1988. «Detection of animal and human enteric viruses in water from the Assomption River and its tributaires». Can J Microbiol, vol. 34, no. 8, p. 967-973.
- PAYMENT, P., M. TRUDEL, S. A. SATTAR, V. S. SPRINGTHORPE, T. P. SUBRAHMANYAN, B. E. GREGORY, A. H. VAJDIC, P. BLASKOVIC, I. J. GUGLIELMI et O. KUDREWKO. 1984. «Virological examination of drinking water: a Canadian collaborative study». Rev Can Microbiol, vol. 30, no. 1, p. 105-112.
- PRESCOTT, HARLET et KLEIN. 1995. «Microbiologie». 2^{ème} édition. De Boeck Université, 1014 p.
- RELOGIO, A., C. SCHWAGER, A. RICHTER, W. ANSORGE et J. Valcarcel. 2002. «Optimization of oligonucleotide based DNA microarrays». Nucleic Acids Res, vol. 30, no. 1, p. 51.

- 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.
- ROETSCHI, A. et J. Y. DERU. 2004. «Détection d'OGM dans les aliments pour animaux: aspects théoriques et pratiques». Revue suisse d'agriculture, vol. 36, no. 4, p. 43-147.
- RUECKER, N. J., S. L. BRAITHWAITE, E. TOPP, T. EDGE, D. R. LAPEN, G. WILKES, W. ROBERTSON, D. MEDEIROS, C. W. SENSEN et N. F. NEUMANN. 2007. «Tracking host sources of *Cryptosporidium* spp. in raw water for improved health risk assessment». Appl Environ Microbiol, vol. 73, no. 12, p. 3945-3957.
- SADOWSKY, M. J., D. R. CALL et J. W. SANTO DOMINGO. 2007. «The future of microbial source tracking studies». Ch. 8 dans: «Microbial source tracking». SANTO DOMINGO. J et M. S. SADOWSKY (eds). ASM Press, Wahington, 285 p.
- SAINT-LAURENT VISION. 2000. 2002. «Fiche d'information – La phase II de Saint-Laurent Vision 2000: Les tributaries».
- 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.
- SCOTT, T. M., T. M. JENKINS, J. LUKASIK et J. B. ROSE. 2005. « Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution». Environ. Sci Technol, vol. 39, no. 1, p. 283-287.
- SCOTT, T. M., M. TROY, 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».
- 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.
- SOULE, M., E. KUHN, F. LOGE, J. GAY et D. R. CALL. 2006. «Using DNA Microarrays To Identify Library-Independent Markers for Bacterial Source Tracking». *Appl Environ Microbiol*, vol. 72, no. 3, p. 1843-1851.
- STEFFAN, R. J. et R. M. ATLAS. 1988. «Amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples». *Appl Environ Microbiol*, vol. 54, no. 9, p. 2185-2191.
- STEWART, J. R., J. SANTO DOMINGO et T. J. WADE. 2007. «Fecal pollution, public health, and microbial source tracking». Ch. 1 dans: «Microbial source tracking». SANTO DOMINGO. J et M. S. SADOWSKY (eds). *ASM Press*, Wahington, 285 p.
- WALKER, J. A., D. A. HUGHES, D. J. HEDGES, B. A. ANDERS, M. E. LABORDE, J. SHEWALE, S. K. SINHA et M. A. BATZER. 2004. «Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements». *Genomics*, vol. 83, no. 3, p. 518-527.
- WANG, R. F., M. L. BEGGS, L. H. ROBERTSON et C. E. CERNIGLIA. 2002. «Design and evaluation of oligonucleotide microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples». *FEMS Microbiol Lett*, vol. 213, no. 2, p. 175-182.
- WATSON, GILMAN, WITKOWSKI et ZOLLER. 1994. «ADN Recombinant». 2^{ième} édition. *De Boeck Université*, 626 p.

WETMUR, J. G. 1991. «DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization». Crit Rev Biochem Mol Biol, vol. 26, no. 3, p. 227-259.

WHEELER, A. L., E. J. BURKE et A. SPAIN. 2003. «Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches». Water Res, vol. 37, no. 16, p. 3978-3982.

WHEELER, A. L., P. G. HARTEL, D. G. GODFREY, J. L. HILL, et W. I. SEGARS. 2002. «Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking». J Environ Qual, vol. 31, no. 4, p.1286-9123.

WHITEHEAD, T. R. et M. A. COTTA. 2000. «Development of molecular methods for identification of *Streptococcus bovis* from human and ruminal origins». FEMS Microbiol Lett, vol. 182, no. 2, p. 237-240.

WHITTAM, T. S. et T. M. BERGHILZ. 2007. «Molecular subtyping, source tracking, and food safety». Ch. 4 dans: «Microbial source tracking». SANTO DOMINGO. J et M. S. SADOWSKY (eds). ASM Press, Wahington, 285 p.

ANNEXE 1 Alignement des séquences mitochondriales

Mouton	GAGCTACTTATAGACAGTTTATTA--GAACCAACTCATCTATGTGGCAA	1327
Boeuf	GAGCTACTCACAACAGTTTACCAA-GAACTAACTCATCTATGTGGCAA	1756
Porc	GAGCTACCCATGAGCAGTTTAAAA--GAACCAACTCATCTATGTGGCAA	2573
Humain	GAGCTACCTAAGAACAGCTAA--AA-GAGCACACCCGCTCTATGTAGCAA	1962
Poulet	GAGCTACTTGCGAGCAGCTAAAATTTGAGCGAACCCGCTCTCTGTTGCAA	2673
	***** *** * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Mouton	ATAGTGAGAAGATCCATAAGTAGAGGTGACATGCCTAACGAGCCTGGTGA	1377
Boeuf	ATAGTGAGAAGATTTGTAAGTAGAGGTGACATGCCTAACGAGCCTGGTGA	1806
Porc	ATAGTGAGAAGACTTGTAGGTAGAGGTGAAAAGCCTAACGAGCCTGGTGA	2623
Humain	ATAGTGGAAGATTTATAGGTAGAGGCGACAAACCTACCGAGCCTGGTGA	2012
Poulet	AGAGTGGGATGACTTGCCAGTAGAGGTGAAAAGCCTACCGAGCCTGGTGA	2723
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Mouton	TAGCTGGTTGTCCAGAAAATGAATTTAGTTTCAGCTTTAAAGATACCAA-	1426
Boeuf	TAGCTGGTTGTCCAGAAAATGAATCTAAGTTTCAGCTTTAAAGATACCAA-	1855
Porc	TAGCTGGTTGTCC-GAGAAAAGAAATTTAGTTCAACTTTAAAAATACCCC-	2671
Humain	TAGCTGGTTGTCC-AAGATAGAATCTTAGTTCAACTTTAAATTTGCCAC	2061
Poulet	TAGCTGGTTACCTGTCAAACGAAATCTAAGTTCCCTTTAACCCACCCCT	2773
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Mouton	AAATACAAATAAATCC-----CACTG-----TATCTTTAAAAGTTAGT	1464
Boeuf	AAATTCAAATAAACCC-----CACTG-----TAGCTTTAAAAGTTAGT	1893
Porc	AAAAACCT-TAAATTC-----CAATG-----TATTTTAAAGAGATAGT	2708
Humain	AGAACCCCTCTAAATCC-----CCTTG-----TAAATTTAACTGTTAGT	2099
Poulet	AAAGACACCCACCTTTGTCAACCTTGAGAACGTTGGGGTTAAGAGCAATT	2823
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Mouton	CTAAAAAGGTACAGCCTTTTAGAAAT--GGGTACAACCTTCACTAGAGAG	1512
Boeuf	CTAAAAAGGTACAGCCTTTTAGAAAC--GGATACAACCTTCACTAGAGAG	1941
Porc	CTAAAAAGGTACAGCCTTTTAGAAAC--GGATACAACCTTCACTAGAGAG	2756
Humain	CCAAAGAGGAACAGCTCTTTGGACACTAGGAAAAAACCTTGTAGAGAGAG	2149
Poulet	CGATGGGGGTACAGCTCCATCGAAAA-AGAACAACCTCCTCCAGCGGA	2872
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Mouton	TAAGATCT-AAAATACCATA--GTAGGCCTAAAAGCAGCCATCAATTAA	1559
Boeuf	TAAAATTT-AACACTACCATA--GTAGGCCTAAAAGCAGCCATCAATTAA	1988
Porc	TAAAATCTTAATACTACCATA--GTAGGCCTAAAAGCAGCCATCAATTGA	2804
Humain	TAAAAAATTTA-ACACCCATA--GTAGGCCTAAAAGCAGCCATCAATTAA	2196
Poulet	TAATAATCACCCCTCCCGCACTGTGGGCCTTCAAGCAGCCACCAACAAA	2922
	*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Mouton	GAAA-GCGTTAAAGCTCAACAACAATAGTATTATTAATCCAGCAATAAC	1608
Boeuf	GAAA-GCGTTAAAGCTCAACAACAAAAATTAATAGATTCCAACAACAA-	2036
Porc	GAAA-GCGTTAAAGCTCAACAATTCACCAACAT-AATCCCAAAAACATA-	2851
Humain	GAAA-GCGTTCAAGCTCAACACCCACTACCTAAAAAATCCCAACATAT-	2244
Poulet	AGAGTGCCTCAAAGCTC-----CCTCATTAAAAAATCTAAATACCCT-	2963
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Mouton	ATTAGCCAACCTCCTAGATTTAATACTGGACTATTCTATTACTAAATAGAA	1658
Boeuf	-ATGATTAACCTCCTAGCCCAATACTGGACTAATCTATTATAGAATAGAA	2085
Porc	-ATAACAACCTCCTAG-CCCAATACCGGACTAATCTATCGAAACATAGAA	2899
Humain	--AACTGAACCTCCTCACACCCA-ATTGGACCAATCTATCACCCATAGAA	2291
Poulet	---ATTGACTCCCTCAACCAA-AGCAGGTTAACCTATGACA-ATAGAA	3007
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Ckmito 1-G		
Mouton	G-AATAATGTTAATATGAGTAACAAGAAATATTTCTCCTC--GCACAAG	1705
Boeuf	GCAATAATGTTAATATGAGTAACAAGAAAAATTTCTCCTT--GCATAAG	2133
Porc	GCAATAATGTCAATATGAGTAACAAGAAAGC-CTTCTCCTC--GCACACG	2946
Humain	GAACATAATGTTAGTATAAGTAACATGAAAACATTTCTCCTCC--GCATAAG	2339
Poulet	GAATCAATGCTAAAATGAGTAATCTGGAACCTATCCTCCTACGGCGTAAA	3057
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

Mouton	ACCATATTTACACTATTTATAGCCAACCTCAACCACAACCACC-CTATCAT	4527	
Boeuf	ACCATATTTACCATATTTATAGCCAATTCACCACCACCACC-CTGTTCAT	4953	
Porc	GCAATATTCATACTATTAATCCACAGCTCAGCAACCACA	5774	Pomito N 4-D
Humain	ACCGCATTCCCTACTACTCAACTTAAACTCCAGCACCACCACC-CTACTAC	5157	Humito N 3-D
Poulet	ACTGTATTCCTA-TCCCTAGCCCCAAATCAAAGTCCCTAAAACCTGTCAACAA	5933	
	* ** * * *		
Mouton	TATCACACACATGAAATAAAGCACCCATCATAACAATTCTAGTCCTCATT	4577	
Boeuf	TATCACACACATGAAATAAACAACCCATATAACCGTCCCTAATTCTTGCC	5003	
Porc	TATCCCATACATGAAACAAATATACCCGTCATCACAAGCCTAA	5824	Pomito 4-D
Humain	TATCTCGCACCTGAAACAAGCTAACATGACTAACCCCTTAATTCCATCC	5207	Humito 3-D
Poulet	TACTCATCTCATGAACATAAACCCTAATAATGCAACTGTAATACTA	5983	
	** * **** * * * * *		
Mouton	ACCCTCCTATCAATAGGAGGACTTCCCCCACTATCAGGATTTATACCCAA	4627	
Boeuf	ACTCTCCTATCCATAGGAGGACTCCCTCCCCTATCTGGGTTTATACCCAA	5053	
Porc	ACCCTACTCTCAATAGGAGGCCTGCCTCCACTATCAGGATTTATGCCAA	5874	
Humain	ACCCTCCTCTCCCTAGGAGGCCTGCCCCGCTAACCGGCTTTTTGCCAA	5257	
Poulet	ACCCTCCTCTCCCTAGTGGCCTCCCACCATTAACCGGCTTCATGCCAA	6033	
	** *		
Mouton	ATGAATAATTATCCAAGAAATAACAAAAAATGACAGCATTATCTTACCCA	4677	
Boeuf	ATGAATAATCATCCAAGAGATAACAAAAAATAACAGCATCATTCTACCCA	5103	
Porc	ATGAATAATTATTCAAGAAATAACAAAAAATGAAAGCATCATCATGCCAA	5924	
Humain	ATGGGCCATTATCGAAGAATTCAAAAAACAATAGCCTCATCATCCCCA	5307	
Poulet	ATGACTCATTATCCAAGAACTAACCAACAAGAAATAACCCCAATAGCCA	6083	
	*** ** *		
Mouton	CCCTCATAGCAATTACAGCACTACTAAACCTATATTTTTATATACGACTT	4727	
Boeuf	CTTTCATAGCAATCACAGCTCTACTAAACTTATATTTTTATATACGACTC	5153	
Porc	CACTCATAGCAATAACAGCACTGCTAAACCTCTATTTCTACATACGACTA	5974	
Humain	CCATCATAGCCACCATCACCTCCTTAACCTCTACTTCTACCTACGCCTA	5357	
Poulet	CAATCATACAATACTATCACTCCCTAAGCCTATTCTTCTACCTCCGACTT	6133	
	* **** *		
Mouton	TTACAATATACCAGTGATGACGAGATGTGATTCGAGAAAGCACCTTCCAA	8749	
Boeuf	TAACAATATACCAATGATGACGAGATGTTATCCGAGAAAGCACCTTCCAA	9173	
Porc	TGACAATATACCAATGGTGACGAGACATTATTCGAGAGAGCACTTCCAA	10003	
Humain	TAACCATATACCAATGATGGCGGATGTAACACGAGAAAGCACATACCAA	9410	
Poulet	TAGTCATGCTGCAATGATGACGAGAGCGTAGTCCGAGAAAGCACCTTCCAG	10134	
	* ** *		
Mouton	GGCCACCATACTCCGGCTGTCCAAAAGGGCCTTCGTTACGGAATGATTCT	8799	
Boeuf	GGCACCATAACCCAGCTGTCCAAAAGGGCCTCCGTTATGGAATAATTCT	9223	
Porc	GGCCACCACACATCAGTTGTCCAAAAGGGCTTACGATACGGTATAATTTT	10053	
Humain	GGCCACCACACACCCTGTCCAAAAGGGCCTTCGATACGGGATAATCCT	9460	
Poulet	GGCCACCACACCCCAACTGTCCAAAAGGGCCTACGATACGGAATAATCCT	10184	
	** *		
Mouton	TTTCATTATCTCCGAAGTTCTATTCTTTACTGGATTTTCTGAGCCTTCT	8849	
Boeuf	TTTTATTATCTCCGAAGTACTATTCTTTACCGGATTTTCTGAGCTTTCT	9273	
Porc	ATTTATTATTTCCGAGGTTCTGTCTTCACTGGATTCTTTTGAGCTTTCT	10103	
Humain	ATTTATTACCTCAGAAGTTTCTTCTCGCAGGATTTTCTGAGCCTTTT	9510	
Poulet	TTTCATTACATCAGAGGCCTTCTTCTCCTAGGATTCTTCTGAGCCTTCT	10234	
	** *		
Mouton	ACCCTCAAGCCTTGCCCCCACACCCGAACCTAGGCGGCTGCTGACCTCCA	8899	
Boeuf	ACCCTCAAGCCTCGCCCCACCCCTGAACCTAGGCGGCTGCTGACCCCCA	9323	
Porc	ACCCTCAAGCCTAGCACCAACACCCGAATTAGGAGGTTGCTGACCCCA	10153	
Humain	ACCCTCCAGCCTAGCCCCCTACCCCAATTAGGAGGGCACTGGCCCCCA	9560	
Poulet	TCCACTCAAGCCTAGCCCCAACACCAGAACTGGGGGGCAATGGCCCCCA	10284	
	***** *		
Mouton	ACAGGCATTACCCACTTAATCCCTTAGAAGTCCCCTACTCAACACCTC	8949	
Boeuf	ACAGGCATTACCCACTAAACCCCTTAGAAGTCCCCTACTCAACACCTC	9373	
Porc	ACAGGAATTACCCACTAAACCCCTTAGAAGTACCCTACTAAACACCTC	10203	
Humain	ACAGGCATCACCCCGCTAAATCCCCTTAGAAGTCCCCTACTCAACACATC	9610	
Poulet	ACAGGAGTCAAACCCCTAAACCCCTTAGAAGTACCCTACTAAATACAGC	10334	
	***** *		

Mouton	TGTCCTTCTAGCCTCAGGAGTATCCATTACTTGAGCTCACCATAGCCTCA	8999	
Boeuf	TGTCCTATTGGCTTCCGGAGTTTCTATTACCTGAGCCCATCATAGTTTAA	9423	
Porc	AATCCTCCTCGCCTCAGGAGTATCCATTACCTGAGCCCATCAGCCTAA	10253	
Humain	CGTATTACTCGCATCAGGAGTATCAATCACCTGAGCTCACCATAGTCTAA	9660	
Poulet	AATCCTCCTAGCCTCAGGAGTACCCGTTACATGGGCTCACACAGCATCA	10384	
	* * * * *		
Mouton	TAGAAGGGAACCGTTACCACATGTTACAGCCCTATTCATTACCATCGCA	9049	Ovmito 2-G
Boeuf	TAGAAGGGGACCGAAAAGCATATATTTACAAGCCCTATTTATCACCATCACA	9473	
Porc	TAGAAGGGGACCGAAAACACATAATCCAAGCACTATCCATCACCATTGCA	10303	
Humain	TAGAAAACAACCGAAAACCAATAATTCAAGCACTGCTTATACAATTTTA	9710	
Poulet	CAGAAGGAAACCGAAAACAAGCCATCCACGCACTAACTCTACAATCCTC	10434	
	**** * * * * *		
Mouton	CTAGGCGTGTACTTACACTGTTACAGGCATCAGAGTATTATGAAGCACC	9099	Ovmito N 2-G
Boeuf	TTAGGAGTCTACTTCACACTACTACAAGCCTCAGAATACTATGAAGCACC	9523	
Porc	CTAGGCGTATACTTCACCTCCTCCAAGCCTCAGAATATTACGAAGCACC	10353	
Humain	CTGGGTCTCTATTTTACCTCCTACAAGCCTCAGAGTACTTCGAGTCTCC	9760	
Poulet	CTAGGATTCCTACTTCACAGCCCTACAAGCAATAGAGTACCATGAAGCCTC	10484	
	* * * * *		
Mouton	CTTTACAATCTCAGACGGAGTTTACGGTTCAACTTCTTCGTAGCTACAG	9149	
Boeuf	TTTTACTATCTCCGACGGAGTTTACGGCTCAACTTTTTTGTAGCCACAG	9573	
Porc	ATTCACAATCTCCGACGGAGTGTATGGATCCACTTCTTTGTGGCTACAG	10403	
Humain	CTTACCATTTCGGACGGCATCTACGGCTCAACATTTTTTGTAGCCACAG	9810	
Poulet	CTTCTCAATCGCTGACAGCGTCTACGGCTCCACCTTCTTCGTGCTACAG	10534	
	** * * * *		
Mouton	GATTTACGGCCTCCATGTATCATCGGATCCACCTTCTAATGTCTGC	9199	
Boeuf	GCTTCCACGGCCTCCAGTATCATTTGGGTCCACCTTCTTAATTGTCTGC	9623	
Porc	GGTTTACGGGTTGCACGTAATCATCGGATCTACTTCTTAGCAGTATGC	10453	
Humain	GCTTCCACGGACTTCACGTCATTTATGGCTCAACTTCTCTACTATCTGC	9860	
Poulet	GGTTCACGGACTACATGTAATCATTGGATCATCCTTTTTAACAGTTTGC	10584	
	* * * * *		
Mouton	TTCTTCCGCCAATTTAAATTTCAATTTACCTCTAGTCACCAFTTCGGTTT	9249	
Boeuf	TTCTTCCGCCAATTTAAATTTCAATTTTACTTCTAACCACCACTTCGGCTT	9673	
Porc	TTACTACGACAACCTAAATTTCACTTTCACATCCAACCACCACTTCGGCTT	10503	
Humain	TTCATCCGCCAACCTAAATTTCACTTTCACATCCAACCACTTCGGCTT	9910	
Poulet	CTCCTACGACTAATCAAATTTCACTTTCACACCAACCACCACTTCGGATT	10634	
	* * * * *		
Mouton	CGAAGCCGCTGCCTGATACTGACACTTCGTAGATGTAGTATGACTTTTCC	9299	
Boeuf	TGAAGCCGGTGCCTGATACTGACACTTCGTAGACGTAGTCTGACTTTTCC	9723	
Porc	TGAAGCCGACGCTGATACTGACACTTCGTAGATGTAGTTTACTATTCC	10553	
Humain	CGAAGCCCGCCTGATACTGGCATTTCGTAGATGTGGTTTACTATTTC	9960	
Poulet	TGAAGCAGCAGCCTGATACTGACACTTCGTAGACATCATCTGACTCTCC	10684	

Mouton	TCTATATATCCATCTACTGATGAGGCTCATGTCCTTTTAGTATTAATTAG	9349	
Boeuf	TCTATGTTTCTATCTATTGATGAGGCTCCTATTCTTTTAGTATTAAGTAG	9773	
Porc	TTTACGTATCAATCTATTGATGAGGATCCTACTCTTTTAGTATTAAGTAG	10603	
Humain	TGTATGTCTCCATCTATTGATGAGGCTTACTCTTTTAGTAT - AAATAG	10009	
Poulet	TCTACATATCCATATACTGATGAGGATCTTGCTCTTCTAGTAT - ACTCAT	10733	
	* * * * *		
Mouton	TACAACTGACTTCCAATCAGTTAGTTTCGGTCT - AATCCGAAAAAGAACA	9398	
Boeuf	TACAGCTGACTTCCAATCAGCTAGTTTCGGTCT - AGTCCGAAAAAGAATA	9822	
Porc	TACAATTGACTTCCAATCAATCAGTTTCGGTAA - ACTCCGAAAAAGAGTA	10652	
Humain	TACCGTTAACTTCCAATTAACCTAGTTTTCGACAA - CATTCAAAAAAGAGTA	10058	
Poulet	TACAACTGACTTCCAATCTTTAAATCTGGTATCAACCCAGAGAAGAGCA	10783	
	*** * * * * *		
Mouton	ATAAAC - - - CTATAATTTACTCTCCTAACTAACTTCACGCTAGCTACATT	9445	Ovmito N 2 -D
Boeuf	ATAAAT - - - TTAATACTAGCCCTCCTGACCAATTTTACACTAGCCACCT	9869	
Porc	ATAAAT - - - ATTATACTAACCTACTCACAAACGTAACCTTAGCCTCCCT	10699	
Humain	ATAAAC - - - TTCGCCTTAATTTAATAATCAACACCTCCTAGCCTTACT	10105	
Poulet	ATGACACACTTACATTTATATACTCTACTATCCTTTCTACTAAGCGCTGC	10833	
	** ** * * *		

Mouton	ACTCGTAACCATCGCATTCTGACTTCCCCAACTGAACGTGTATTTCAGAAA	9495	
Boeuf	ACTCGTCATCATCGCATTCTGACTTCCCCAACTAAATGTATACTCTGAGA	9919	
Porc	ACTCGTACTAATCGCATTCTGACTACCCCAACTAAACGCATATTTCAGAAA	10749	
Humain	ACTAATAATTATTACATTTTGACTACCACAACTCAACGGCTACATAGAAA	10155	
Poulet	ACTAACTACTATAAACTTTTGACTAGCCCAAATAGCCCCAGACACAGAAA	10883	
	*** ** *		
Mouton	AAACAAGCCCATACGAATGTGGATTGACCCCATAGGGTCTGCTCGCCTC	9545	
Boeuf	AAACAAGCCCATACGAATGTGGATTGACCCCATAGGATCAGCCCGCCTT	9969	
Porc	AAACAAGCCCATATGAATGTGGATTGACCCCATAGGATCAGCAGCCTC	10799	
Humain	AATCCACCCCTTACGAGTGGGCTTCGACCCCTATATCCCCGCCCCGCTC	10205	
Poulet	AACTGTACCCGTACGAATGCGGATTTGACCCACTAGGATCAGCCCGACTC	10933	
	** *		
Mouton	CCCTTCTCTATAAAATTTCTTCT-AGTAGCCATCACATTCTCTTTTG	9594	
Boeuf	CCCTTCTCTATAAAATTTCTTCT-GGTAGCCATCACATTCTCTTATTG	10018	
Porc	CCATTCTCAATAAAATTTTCTTCT-AGTAGCCATTACATTTCTCTTTTG	10848	
Humain	CCTTCTCCATAAAATTTCTTCT-AGTAGCTATTACCTTCTTATTATTG	10254	
Poulet	CCATTCTCAATCCGATTCTTCTCAGTAGCCATCTATTCTTCTATTG	10983	
	** *		
Mouton	ATCTAGAAATGCACTACTCCTACCCTACCATGAGCCTCACAACAACCT	9644	
Boeuf	ACCTAGAAATGCACTCCTCCTACCCTGCCATGAGCCTCACAACAGCA	10068	
Porc	ATCTAGAAATGCGCCTTCTCCTTCCCTACCATGAGCCTCACAACAAC	10898	
Humain	ATCTAGAAATGCGCCTCCTTTTACCCCTACCATGAGCCTCACAACAAC	10304	
Poulet	ACCTAGAAATGCGCCTGCTTCTCCCTTCCATGAGCCTCACAACCTGCA	11033	
	* *		
Mouton	AATCTAAACACAATGCTCACCATAGCTCTCTCCTAATCTTCTACTAGC	9694	Ovmito 2-D
Boeuf	AATCTAAACACAATGCTTACCATAGCCCTTCTCCTAATCTTCTACTAGC	10118	
Porc	AATCTAAACACAATACTTACAATAGCACTATTCTTCTTATCCTACTAGC	10948	
Humain	AACCTGCCACTAATAGTTATGTCTATCCCTCTTATTAATCATCATCTAGC	10354	
Poulet	CACCCTATAATAACCCTTACTTGAGCCACCCTATCATCGCCCTCCTCAC	11083	
	* *		
Mouton	CGTAAGCCTGGCCTACGAATGAACTCAAAAAGGACTCGAATGAACCGAAT	9744	
Boeuf	TGTAAGCCTAGCCTATGAGTGAACCTCAAAAAGGACTAGAATGAACCGAAT	10168	
Porc	AGCAAGCCTAGCATACGAATGAACCCAAAAAGGCCTAGAATGAGCAGAAAT	10998	
Humain	CCTAAGTCTGGCCTATGAGTGAACCTCAAAAAGGATTAGACTGAACCGAAT	10404	
Poulet	ATTTGGTCTCATCTACGAATGAACTCAGGGCGGCTTAGAATGAGCAGAAAT	11133	
	* *		
Mouton	A--TGGTATTTAGTTTAAAACAAAAATAATGATTTGACTCATTAGATTA	9792	
Boeuf	A--TGGTACTTAGTTTAAAATAAAAATAATGATTTGACTCATTAGATTA	10216	
Porc	A--TGATAATTAGTTTAAAACAAAAATAATGATTTGACTCATTAGACTA	11046	
Humain	---TGGTATATAGTTTAAAACAAAAATAATGATTTGACTCATTAAATTA	10450	
Poulet	AACAGAAAGTTAGTCTAAC-TAAGACAGCTGGTTTTCGACCCAGCAAATTA	11182	
	* *		
Mouton	TGATTAAGCTCATAACTACCAAATGTCCCTCGTATACATAAACATTATAA	9842	
Boeuf	TGATTTAATTCATAATTACCAAATGTCTATAGTATACATAAACATTATAA	10266	
Porc	TGATTTACTTCATAATTATCAAGTGCCATTAGTATATATAAACATCATT	11096	
Humain	TGAT--AATCATATTTACCAAATGCCCTCATTACATAAATATTATAC	10497	
Poulet	TAGGCCACCTATAACTTTCTTATGTCTCCCTACACTTCAGCTTCTATT	11232	
	* *		
Mouton	TGGCATTACAGTATCCCTCACAGGACTACTAATATACCGATCCCACCTA	9892	
Boeuf	TAGCATTACAGTATCTCTGTAGGACTACTAATATACCGATCCCACCTA	10316	
Porc	TAGCATTGCGGATCGCCCTTGCAGGGTACTTATATATCGATCTCACTTA	11146	
Humain	TAGCATTTACCATCTCACTTCTAGGAATACTAGTATATCGCTCACACCTC	10547	
Poulet	CTGCATTACATTACGAGCCTAGGACTAGCATTCCACCGAACACACCTC	11282	
	***** *		
Mouton	ATATCTTCCCTCCTATGCCTAGAAGGAATAATACTATCCCTATTTATTTT	9942	
Boeuf	ATATCTTCCCTTCTATGCTTAGAAGGAATAATGCTATCCCTATTCGTTAT	10366	
Porc	ATATCTTCACTACTATGCCTAGAAGGAATGATACTATCACTATTTCATCAT	11196	
Humain	ATATCTTCCCTACTATGCCTAGAAGGAATAATACTATCGCTGTTTATTAT	10597	
Poulet	ATCTCTGCCCTACTATGCCTAGAGACATAATACTATCCATATTCATCCC	11332	
	** *		

Mouton TACGCAATCTTACGATCAATCCCTAATAAACTAGGAGGAGTCTCGCCCT 14969
 Boeuf TACGCAATCTTACGATCAATCCCCAACAACTAGGAGGAGTACTAGCCCT 15394
 Porc TACGCTATTCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGTGGCCCT 16222
 Humain TACACAATTCTCCGATCCGTCCTTAACAACTAGGAGGCGTCTTGCCCT 15627
 Poulet TATGCCATCTACGCTCCATCCCCAACAACTTGGAGGTGTACTAGCCCT 15785
 ** * ** * ** * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Mouton AATCCTCTCAATCCTAGTCTAGTAATTATACCCCTCCTCCATACATCAA 15019
 Boeuf AGCCTTCTCTATCCTAATCTTGCTCTAATCCCCCTACTACACACCTCCA 15444
 Porc AGTAGCCTCCATCCTAATCCTAATTTAATGCCCATACTACACACATCCA 16272
 Humain ATTACTATCCATCCTCATCCTAGCAATAATCCCCATCCTCCATATATCCA 15677
 Poulet AGCAGCCTCAGTCTCATCCTCTTCCCTAATCCCCCTCCTCCACAAATCTA 15835
 * ** **** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Mouton AGCAACGGAGCATAAATATTCCGACCAATCAGTCAATGTATATTCTGAATC 15069
 Boeuf AACAAACGAAGCATAAATATTCCGACCACTCAGCCAATGCCTATTCTGAGCC 15494
 Porc AACAAACGAAGCATAAATTTCCGACCACTAAGTCAATGCCTATTCTGAATA 16322
 Humain AACAAACGAAGCATAAATTTCCGCCCCTAAGCCAATCACTTTATTGACTC 15727
 Poulet AACAAACGAACAATAACCTTCCGACCACTCTCCAAACCTATTCTGACTT 15885
 * **** * **** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Mouton CTAGTAGCCGACCTATTAACACTCACATGAATTGGAGGCCAGCCAGTTGA 15119
 Boeuf CTAGTAGCAGACCTACTGACACTCACATGAATTGGAGGACAACCAGTCTGA 15544
 Porc CTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGAGGACAACCCGTAGA 16372
 Humain CTAGCCGACGACCTCCTCATTCTAACCTGAATCGGAGGACAACCAGTAAG 15777
 Poulet CTAGTAGCCAACCTTCTTATCCTAACCTGAATCGGAAGCCAACCAGTAGA 15935
 **** ** **** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Mouton ACACCCCTACATCATTATTGGACAACCTAGCATCTATTATATATTTCTTAA 15169
 Boeuf ACACCCATATATCACCATCGGACAACCTAGCATCTGTCTTACTTCTCTCC 15594
 Porc ACACCCGTTTCATCATCATCGGCCAAGTCCATCTTATACTTCTCTAA 16422
 Humain CTACCCTTTTACCATCATTTGGACAAGTAGCATCCGTACTATACTTACAAA 15827
 Poulet ACACCCCTTTCATCATCATTTGGCCAATAGCATCCCTCTCTTACTTACCAA 15985
 **** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Bomito 2 -D Bomito N 2 -D

Mouton TCATTCTAGTCATAATACCAGTAGCTAGCATCATCGAAAACAACCTCCTA 15219
 Boeuf TCATCCTAGTGCTAAATACCAACCGGCCGACAATCGAAAACAAATTACTA 15644
 Porc TCATTCTAGTATTGATACCAATCACTAGCATCATCGAAAACAACCTATTA 16472
 Humain CAATCCTAATCCTAATAACCAACTATCTCCCTAATTGAAAACAAATACTC 15877
 Poulet TCCTACTTATCCTCTTCCCCACAATCGGAACACTAGAAAACAAATACTC 16035
 * ** * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Mouton AAATGAAGACAAGTCTTTGTAGTACAA - TCAATATACTGGTCTTGTA AAC 15268
 Boeuf AAATGAAGACAGGTCTTTGTAGTACAT - CTAATATACTGGTCTTGTA AAC 15693
 Porc AAATGAAGA - - - GTCTTCGTAGTATAT - AAAATACCTGGTCTTGTA AAC 16518
 Humain AAATG - - GGCCTGTCTTTGTAGTATAAACTAATAACCCAGTCTTGTA AAC 15925
 Poulet AACTACTAAAATACTCTAATAGTTTAT - GAAAAACATTTGGTCTTGTA AAC 16084
 ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Mouton CAGAGAAGGAGAACAACCAACCTCCCTAAGACTCAAGGAAGAAG - CTATA 15317
 Boeuf CAGAGAAGGAGAACAACCTAACCCTCCCTAAGACTCAAGGAAGAAA - CTGCA 15742
 Porc CAGAAAAGGAGGGCCACC - - CCTCCCCAAGACTCAAGGAAGGAG - AC - TA 16564
 Humain CGGAGATGAAAACTTTT - - TCCAAGGACAAATCAGAGAAAAAGTCTTTA 15973
 Poulet CAAAAACTGAAGACTCCACCCTTCTTAGAGTATCAGAAAAGGAGGCTCA 16134
 * * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Mouton G - - CCCACTATCAACACCCAAAGCTGAAGTTCTA - CTTAAACTATTCCC 15364
 Boeuf G - - TCTCACCATCAACCCCAAGCTGAAGTTCTA - TTTAAACTATTCCC 15789
 Porc A - - CTCCGCCATCAGCACCCAAAGCTGAAATTCTA - ACTAAATTATTCCC 16611
 Humain A - - CTCCACCATTAGCACCCAAAGCTAAGATTCTAATTTAAACTATTCTC 16021
 Poulet AACCTCCATCTCCAGCTCCCAAAGCTGGTATTTCAAATAAACTACTCTC 16184
 * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

```

Mouton      TGAATCATTATCAACGATACTTATCAATATATTTCCAAAAATATAAAGAG 15414
Boeuf       TGAACA-----CTATTAATATAGTTCCATAAATACAAAGAG 15825
Porc        TG----- 16613
Humain      TGTTC-----TTCATGGGGAAGCAGATTG---GGTA 16051
Poulet      TGAAC-----CCTTAAACCGCCCGAATTGCCCCCGAGA 16219
**

```

Figure 25 : Alignement des séquences mitochondriales des cinq espèces (mouton, bœuf, porc, humain et poulet) ayant conduits aux amorces spécifiques simples et internes : Humito 3, Humito N 3, Ovmito 2, Ovmito N 2, Bomito 2, Bomito N 2, Pomito 4, Pomito N 4, Ckmito 1, Ckmito N 1. Les numéros d'accès dans la banque de données GenBank des cinq espèces sont: J01415 (humain), AF010406 (mouton), V00654 (bœuf), AF034253 (porc) et AY235570 (poulet). * = nucléotides communes aux cinq espèces.

ANNEXE 2 Carte des différentes régions d'échantillonnage.



Figure 26: Carte représentant les diverses régions d'échantillonnages. No. 1 : Station d'épuration d'Auteuil. No. 2 : station d'épuration de Fabreville. No. 3 : Station de filtration de la rivière l'Assomption. No. 4 : Station de filtration Sainte Rose. No. 5 : Rivière des Mille-Îles. No. 6 : rivière l'Assomption nord. No. 7 : rivière l'Assomption sud.