

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT ARMAND-FRAPPIER**

**IDENTIFICATION DES SOURCES DE CONTAMINATION FÉCALE
DANS LES EAUX DE SURFACE PAR DÉTECTION DE L'ADN
MITOCHONDRIAL COMME MARQUEUR SPÉCIFIQUE D'ESPÈCE**

Par

Marianne IMBEAU

Baccalauréat ès science (B.Sc.)

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

Maître ès science (M.Sc.)

Microbiologie appliquée

Février 2011

Ce mémoire intitulé

**IDENTIFICATION DES SOURCES DE CONTAMINATION FÉCALE
DANS LES EAUX DE SURFACE PAR DÉTECTION DE L'ADN
MITOCHONDRIAL COMME MARQUEUR SPÉCIFIQUE D'ESPÈCE**

et présenté par

Marianne IMBEAU

a été évalué par un jury composé de

M. François LÉPINE, Ph.D.
INRS-Institut Armand-Frappier

Président du jury

M. Richard VILLEMUR, Ph.D.
INRS-Institut Armand-Frappier

Directeur de recherche

M. Pierre PAYMENT, Ph.D.
INRS-Institut Armand-Frappier

Codirecteur de recherche

Mme Josée HAREL, Ph.D.
Université de Montréal

Examinatrice externe

RÉSUMÉ

La contamination fécale humaine et animale des eaux de surface a des impacts considérables sur l'environnement et la santé publique. En effet, l'utilisation récréative ou domestique de cette eau favorise le contact entre la population et les microorganismes fécaux potentiellement pathogènes, allant jusqu'à provoquer l'éclosion de maladies infectieuses. Plusieurs situations peuvent causer ce type de contamination et le problème peut s'avérer très complexe dans un grand bassin versant. Pour être en mesure d'élaborer des stratégies de réhabilitation des cours d'eau problématiques, les gestionnaires et les scientifiques ont besoin d'un outil de détection spécifique leur permettant d'identifier directement l'espèce animale qui est à l'origine de la contamination et, indirectement, de cibler l'activité qui cause la contamination.

Ce projet proposait de mettre au point une méthodologie d'amplification nPCR à haut débit permettant le suivi des marqueurs mitochondriaux pour plusieurs espèces animales et de l'appliquer à l'étude des sources de contamination fécale dans des bassins versants dont la contamination est récurrente. Il se basait sur des études antérieures ayant démontré que la détection d'ADN mitochondrial dans l'eau est assez spécifique et sensible pour qu'il soit utilisé comme indicateur de la source d'une contamination fécale.

Tout d'abord, un protocole d'amplification nPCR qualitative en temps réel a été développé et optimisé pour détecter spécifiquement les marqueurs mitochondriaux de 14 espèces animales susceptibles d'être à la source d'une contamination fécale. La validation effectuée à l'aide d'ADN total extrait de tissus animaux a présenté d'excellents résultats de spécificité et de sensibilité d'amplification. L'application de ce protocole à l'analyse d'eaux usées a permis d'y détecter la présence d'ADNmt mitochondrial d'humain, de porc, de bœuf, et de cheval.

En parallèle, des échantillons d'eau de surface du bassin versant de la rivière l'Assomption (Québec) ont été prélevés pour effectuer le décompte des coliformes thermotolérants et en extraire l'ADN total. Une collaboration avec Agriculture et

Agroalimentaire Canada a aussi permis l'accès à une série d'échantillons d'ADN extrait des eaux de surface du bassin versant de la rivière South Nation (Ontario). Les résultats issus de l'analyse des échantillons de ces deux bassins versants indiquent une prédominance des marqueurs mitochondriaux humains quoique cinq autres espèces d'élevage y aient parfois été détectées. L'occurrence de marqueurs mitochondriaux dans les eaux de surface n'a toutefois pas présenté de réelle continuité entre les répliquats ou entre les sites d'échantillonnages situés en amont et en aval d'un même cours d'eau.

Finalement, une méthodologie alternative a été développée pour permettre l'éventuelle adaptation du protocole de détection à une plateforme robotique. Sa validation et son application à l'analyse d'un échantillon d'eaux usées a permis d'en démontrer l'efficacité pour la détection de 11 des 14 espèces ciblées. Cette approche n'a toutefois pas pu être appliquée à la détection de 3 des 14 espèces en raison des structures secondaires formées par les paires d'amorces spécifiques correspondantes. La robotisation des analyses minimiserait le coût des réactifs et de la main d'œuvre tout en maximisant le débit, ce qui serait favorable à l'adoption à grande échelle de l'ADNmt comme marqueur spécifique d'espèce pour identifier les sources de contamination fécale dans les eaux de surface.

Étudiante

Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur et mon co-directeur de recherche, les professeurs Richard Villemur et Pierre Payment, pour m'avoir confié ce projet tout en me permettant à de nombreuses occasions de participer à des réunions et des congrès scientifiques.

Je remercie également tous les collaborateurs ayant participé directement à l'avancement de ce projet. Je souligne particulièrement le travail du Pr. Luke Masson et de son étudiante Minh Vuong (IRB-CNRC); l'importante contribution technique de Karla Vasquez; l'expertise en microbiologie et l'excellence pédagogique de Annie Locas Ph.D.; l'expertise en robotique et les conseils de Olivier Chambenoît; l'implication du Pr. Martin Lanthier (Agriculture et Agroalimentaire Canada). Aussi, ce projet n'aurait pas été possible sans l'appui financier des organismes subventionnaires, soit la Fondation Armand-Frappier, le CRSNG et le Réseau Canadien de l'Eau.

Ce fut un plaisir de côtoyer quotidiennement les membres du groupe de recherche en microbiologie de l'environnement. Je remercie tout particulièrement Julie Auclair et Martin Lamarche pour leurs judicieux conseils ainsi que Julianne Ouelette, Julie Ménard, Chantal Lachance, Danielle Dubeau et Valérie Dekimpe pour leur bonne humeur chaque matin.

Finalement, je témoigne de ma reconnaissance envers mes amis et ma famille qui ne cessent de m'inspirer, m'encourager et me supporter dans tout ce que j'entreprends.

CONTRIBUTIONS

Contributions des scientifiques impliqués dans le projet de recherche

| Sections des résultats | Étapes | M. Imbeau | K. Vazquez | A. Locas | M. Vuong | M. Lanthier |
|------------------------|--|-----------|------------|----------|----------|-------------|
| | Rédaction du mémoire | ✓ | | | | |
| Aucune | Mise au point de la méthode biomoléculaire | | | | | |
| 3.1.1 et 3.1.2 | Conception des amorces consensuelles | ✓ | | | ✓ | |
| 3.1.2 et 3.1.3 | Validation des amorces consensuelles | ✓ | | | | |
| 3.1.1 | Conception et validation des amorces spécifiques | ✓ | | | | |
| 3.2.1 et 3.2.2 | Extraction d'ADN des tissus animaux | ✓ | | | | |
| 3.3 | Optimisation des conditions d'amplification | ✓ | ✓ | | | |
| 3.2.3 | Inhibition par l'ADN matrice non spécifique | ✓ | | | | |
| 3.4 | Purification des amplicons consensuels | ✓ | | | | |
| | Détection par lecture de fluorescence finale | ✓ | | | | |
| 3.5.1 | Bassin versant de la rivière l'Assomption | ✓ | | | | |
| 3.5.1 | Récolte et filtration des échantillons | | ✓ | ✓ | ✓ | |
| 3.5.3 | Préparation de l'ADN | | ✓ | | | |
| 3.5.2 et 3.5.3 | Analyse microbienne | | | ✓ | | |
| | Analyse biomoléculaire | ✓ | ✓ | | | |
| 3.6 | Bassin versant de la rivière South Nation | | | | | ✓ |
| 3.6 | Récolte et filtration des échantillons | | | | | ✓ |
| 3.6 | Préparation de l'ADN | | | | | ✓ |
| 3.6 | Analyse microbienne | | | | | ✓ |
| 3.6 | Analyse biomoléculaire | | ✓ | | | |

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-------------|
| RÉSUMÉ | V |
| REMERCIEMENTS | VII |
| CONTRIBUTIONS..... | IX |
| TABLE DES MATIÈRES..... | XI |
| LISTE DES TABLEAUX..... | XV |
| LISTE DES FIGURES | XVII |
| LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS | XXI |
| INTRODUCTION | 1 |
| CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE | 3 |
| 1.1 Les bassins versants | 3 |
| 1.1.1 La gestion intégrée de l'eau par bassin versant | 3 |
| 1.1.2 Le bassin versant de la rivière l'Assomption..... | 4 |
| 1.1.3 Le bassin versant de la rivière South Nation | 5 |
| 1.2 La contamination fécale des eaux de surface..... | 6 |
| 1.2.1 Causes et conséquences..... | 6 |
| 1.2.2 Les indicateurs de la contamination fécale..... | 7 |
| 1.2.3 L'analyse des indicateurs microbiens par biologie moléculaire | 10 |
| 1.2.4 Les recommandations gouvernementales | 11 |
| 1.3 Détermination de la source de contamination fécale | 13 |
| 1.3.1 Les marqueurs spécifiques chimiques | 14 |
| 1.3.2 Les marqueurs spécifiques microbiens..... | 14 |
| 1.3.3 Les marqueurs spécifiques eucaryotes | 16 |
| 1.4 Utilisation de l'ADN mitochondrial comme marqueur spécifique d'espèce | 17 |
| 1.4.1 La mitochondrie et le génome mitochondrial..... | 17 |
| 1.4.2 Les utilisations de l'ADN mitochondrial comme marqueur spécifique d'espèce..... | 18 |
| 1.4.3 L'ADN mitochondrial dans les fèces | 21 |

| | |
|---|-----------|
| CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES | 23 |
| 2.1 Préparation des échantillons..... | 23 |
| 2.1.1 Échantillonnage..... | 23 |
| 2.1.2 Filtration de l'eau..... | 28 |
| 2.1.3 Extraction de l'ADN..... | 29 |
| 2.1.4 Purification de l'ADN..... | 30 |
| 2.1.5 Amplification PCR du gène de l'ARN ribosomal 16S..... | 31 |
| 2.1.6 Électrophorèse sur gel d'agarose | 31 |
| 2.2 Décompte des coliformes thermotolérants | 33 |
| 2.3 Amplification PCR consensuelle de l'ADN mitochondrial animal..... | 34 |
| 2.3.1 Conception et validation <i>in silico</i> des amorces consensuelles | 34 |
| 2.3.2 Amplification PCR consensuelle | 38 |
| 2.3.3 Purification du produit d'amplification PCR consensuelle..... | 38 |
| 2.4 Amplification nPCR spécifique de l'ADN mitochondrial animal..... | 38 |
| 2.4.1 Conception des amorces spécifiques..... | 38 |
| 2.4.2 Amplification nPCR spécifique en temps réel | 44 |
| 2.4.3 Amplification nPCR spécifique conventionnelle | 44 |
| 2.4.4 Détection du produit d'amplification final par lecture de fluorescence | 45 |
| 2.4.5 Méthode d'amplification nPCR mise au point par Randa Kortbaoui..... | 46 |
| 2.5 Dilutions des amplicons consensuels | 47 |
| 2.6 Séquençage partiel de l'ADN mitochondrial..... | 48 |
| CHAPITRE 3 : RÉSULTATS..... | 51 |
| 3.1 Validation des amorces consensuelles et spécifiques | 51 |
| 3.1.1 Extraction de l'ADN matrice | 51 |
| 3.1.2 Validation des amorces consensuelles et spécifiques..... | 53 |
| 3.1.3 Analyse des eaux usées de la station de traitement de Rosemère-Lorraine | 56 |
| 3.2 Optimisation des conditions d'amplification PCR..... | 61 |
| 3.2.1 Température d'appariement | 61 |
| 3.2.2 Concentration des amorces spécifiques | 63 |
| 3.2.3 Purification des produits de l'amplification PCR consensuelle | 65 |
| 3.3 Inhibition par l'ADN matrice non-spécifique | 70 |
| 3.4 Détection du produit d'amplification final par lecture de fluorescence | 71 |
| 3.5 Analyse des eaux de surface du bassin versant de la rivière l'Assomption | 74 |
| 3.5.1 Échantillonnage et préparation des échantillons d'eau de surface | 74 |
| 3.5.2 Amplifications PCR consensuelle et nPCR spécifique de l'ADN mitochondrial | 80 |
| 3.5.3 Identification des sources de contamination fécale..... | 82 |
| 3.6 Analyse des eaux de surface du bassin versant de la rivière South Nation | 95 |

| | |
|--|------------|
| CHAPITRE 4 : DISCUSSION..... | 107 |
| 4.1 Conception des amorces | 107 |
| 4.1.1 Choix des espèces animales..... | 107 |
| 4.1.2 Choix des sources d'ADN matrice | 108 |
| 4.1.3 Choix de la stratégie d'amplification PCR | 110 |
| 4.1.4 Critères de conception des amorces spécifiques..... | 112 |
| 4.2 Validation des amorces..... | 113 |
| 4.2.1 Universalité des amorces consensuelles | 113 |
| 4.2.2 Spécificité des amorces spécifiques | 115 |
| 4.3 Optimisation des conditions d'amplification PCR et nPCR | 117 |
| 4.3.1 Conditions d'amplification PCR par les amorces consensuelles..... | 117 |
| 4.3.2 Conditions d'amplification nPCR par les amorces spécifiques..... | 117 |
| 4.4 Inhibition par l'ADN matrice non-spécifique..... | 118 |
| 4.5 Amplification sur plateforme robotique | 120 |
| 4.6 Les eaux de surface du BVRA et du BVRSN | 121 |
| 4.6.1 Récolte et préparation des échantillons d'eau de surface | 122 |
| 4.6.2 Extraction et purification de l'ADN | 124 |
| 4.6.3 Quantification de la contamination fécale | 126 |
| 4.6.4 Identification des sources de contamination fécale dans les eaux usées et les eaux de surface | 127 |
| 4.6.5 Pertinence de la méthode..... | 131 |
| CONCLUSION | 135 |
| LISTE DE RÉFÉRENCES | 137 |
| ANNEXE A : Alignement des séquences amplifiées par les amorces consensuelles et spécifiques chez les 14 espèces animales sélectionnées pour le projet de recherche..... | A-1 |
| ANNEXE B : Description des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption et du bassin versant de la rivière South Nation. | B-1 |
| ANNEXE C : Volume filtré et turbidité des échantillons récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption, passage sur PVPP et spectrophotométrie des produits d'extraction d'ADN...C-1 | C-1 |

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|----------------|---|-----|
| Tableau 2.I | Composition du milieu de culture m FC Agar..... | 33 |
| Tableau 2.II | Séquences alignées pour la validation <i>in silico</i> des amorces consensuelles. | 36 |
| Tableau 2.III | Rapport taxonomique des résultats de BLAST pour les séquences des amorces consensuelles MI50-F et MI50-R. | 37 |
| Tableau 2.IV | Séquences alignées pour concevoir chaque paire d'amorces spécifiques..... | 40 |
| Tableau 2.V | Rapport taxonomique des résultats de BLAST pour les séquences des amorces spécifiques. | 42 |
| Tableau 2.VI | Température de dénaturation et structures secondaires théoriques adoptées par les amorces consensuelles et spécifiques..... | 43 |
| Tableau 2.VII | Amorces d'amplification PCR et nPCR conçues par Randa Kortbaoui | 47 |
| Tableau 2.VIII | Séquence des paires d'amorces utilisées pour le séquençage de l'ADNmt du goéland | 48 |
| Tableau 2.IX | Séquence des paires d'amorces utilisées et taille de l'amplicon généré. | 49 |
| Tableau 3.I | Spectrophotométrie de l'ADN total extrait de tissus animaux et d'eaux usées de la station de traitement de Rosemère-Lorraine. | 52 |
| Tableau 3.II | Température de dénaturation des amplicons générés par les amorces spécifiques. | 57 |
| Tableau 3.III | Moyenne des passages sur PVPP et des lectures de spectrophotométrie de l'ADN total extrait des échantillons d'eau de surface récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption. | 77 |
| Tableau 3.IV | Comparaison des résultats positifs d'analyse des échantillons BVRA 2009-A par deux différentes méthodes de détection spécifique des marqueurs mitochondriaux. | 84 |
| Tableau 3.V | Analyse microbiologique et biomoléculaire des eaux de surface du bassin versant de la rivière l'Assomption..... | 85 |
| Tableau 3.VI | Analyse microbiologique et biomoléculaire des eaux de surface du bassin versant de la rivière South Nation..... | 96 |
| Tableau 3.VII | Moyenne des décomptes de coliformes thermotolérants des échantillons d'eau de surface du bassin versant de la rivière South Nation..... | 101 |

| | | |
|---------------|---|------|
| Tableau B.I | Photographies aériennes et caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption..... | B-2 |
| Tableau B.II | Caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière South Nation..... | B-13 |
| Tableau C.III | Volume filtré et turbidité des échantillons récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption..... | C-2 |
| Tableau C.IV | Spectrophotométrie de l'ADN total extrait des échantillons d'eau de surface récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption en juin 2008 (série de filtrations A)..... | C-3 |
| Tableau C.V | Spectrophotométrie de l'ADN total extrait des échantillons d'eau de surface récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption en juin 2008 (série de filtrations B)..... | C-4 |
| Tableau C.VI | Spectrophotométrie de l'ADN total extrait des échantillons d'eau de surface récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption en octobre 2009 (série de filtration A)..... | C-5 |
| Tableau C.VII | Spectrophotométrie de l'ADN total extrait des échantillons d'eau de surface récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption en octobre 2009 (série de filtration B)..... | C-6 |

LISTE DES FIGURES

| | | |
|------------|---|----|
| Figure 1.1 | Estimation du nombre annuel de publications ayant pour sujet la détermination de la source d'une contamination fécale. | 13 |
| Figure 1.2 | Le génome mitochondrial humain. | 20 |
| Figure 1.3 | Arbre taxonomique des séquences disponibles du génome mitochondrial animal complet. | 20 |
| Figure 2.1 | Station de traitement des eaux usées de Rosemère-Lorraine. | 24 |
| Figure 2.2 | Niveau d'eau brute et débit de la rivière des Mille-Iles. | 24 |
| Figure 2.3 | Échantillonneur d'eau de surface. | 25 |
| Figure 2.4 | Stations d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption. | 26 |
| Figure 2.5 | Stations d'échantillonnage du bassin versant de la rivière South Nation. | 27 |
| Figure 2.6 | Assemblage de filtration des échantillons d'eau. | 29 |
| Figure 2.7 | Marqueurs de poids moléculaire d'ADN. | 32 |
| Figure 3.1 | Produits d'extraction de l'ADN. | 52 |
| Figure 3.2 | Stratégie de détection et d'identification de l'ADNmt humain par amplification PCR consensuelle et amplification nPCR spécifique. | 54 |
| Figure 3.3 | Amplification PCR consensuelle générée à partir d'ADN purifié de tissus animaux. | 54 |
| Figure 3.4 | Spécificité de l'amplification nPCR par les amorces GOMito6. | 54 |
| Figure 3.5 | Spécificité des amplifications nPCR par les amorces spécifiques. | 55 |
| Figure 3.6 | Courbe de dénaturation caractéristique des produits d'amplification nPCR générés par chaque paire d'arocces spécifiques. | 58 |
| Figure 3.7 | Courbe de dénaturation des produits d'amplification nPCR en temps réel générés lors de la détection des marqueurs mitochondriaux dans les eaux usées de la station de traitement de Rosemère-Lorraine. | 60 |
| Figure 3.8 | Optimisation de la température d'appariement de la paire d'amorces consensuelles MI50. | 61 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Figure 3.9 | Optimisation de la température d'appariement des amorces spécifiques..... | 62 |
| Figure 3.10 | Efficacité et spécificité de l'amplification générée par différentes concentrations d'amorces spécifiques. | 64 |
| Figure 3.11 | Courbe de dénaturation des produits d'amplification générés par différentes concentrations d'amorces. | 65 |
| Figure 3.12 | Influence de la dilution de l'ADN matrice ou des amplicons consensuels sur la spécificité de l'amplification nPCR spécifique. | 67 |
| Figure 3.13 | Amplification nPCR spécifique des rétentats et filtrats de purification des produits d'amplification PCR consensuelle. | 69 |
| Figure 3.14 | Sensibilité relative des amorces spécifiques..... | 70 |
| Figure 3.15 | Fluorescence relative des produits d'amplification nPCR par les amorces spécifiques à l'humain à partir d'amplicons consensuels humains dilués en série. | 72 |
| Figure 3.16 | Fluorescence relative des produits d'amplification nPCR de l'ADN extrait des eaux usées de la station de traitement de Rosemère-Lorraine par chacune des paires d'amorces spécifiques..... | 73 |
| Figure 3.17 | Produits d'extraction et de purification de l'ADN. | 77 |
| Figure 3.18 | Amplification PCR du gène de l'ARNr 16S bactérien des échantillons d'eau de surface du bassin versant de la rivière l'Assomption. | 78 |
| Figure 3.19 | Reprise de l'amplification PCR du gène de l'ARNr 16S bactérien des échantillons du bassin versant de la rivière l'Assomption suite aux purifications supplémentaires..... | 79 |
| Figure 3.20 | Amplification PCR consensuelle MI50 de l'ADN purifié des échantillons d'eau de surface..... | 81 |
| Figure 3.21 | Filtrat de la purification des produits d'amplification PCR consensuelle MI50..... | 81 |
| Figure 3.22 | Réplicats d'analyse effectués pour chaque échantillon prélevé en 2008..... | 84 |
| Figure 3.23 | Réplicats d'analyse effectués pour chaque échantillon prélevé en 2009..... | 84 |
| Figure 3.24 | Taux de contamination fécale de l'eau de surface des sites d'échantillonnage du bassin versant de la Rivière l'Assomption. | 89 |
| Figure 3.25 | Localisation des marqueurs mitochondriaux humains détectés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption. | 90 |
| Figure 3.26 | Localisation des marqueurs mitochondriaux porcins détectés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption. | 91 |

| | | |
|-------------|---|-----|
| Figure 3.27 | Localisation des marqueurs mitochondriaux de bœuf détectés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption..... | 92 |
| Figure 3.28 | Localisation des marqueurs mitochondriaux de mouton détectés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption..... | 93 |
| Figure 3.29 | Localisation des marqueurs mitochondriaux de coq détectés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption..... | 94 |
| Figure 3.30 | Taux de contamination fécale moyen des échantillons d'eau de surface du bassin versant de la rivière South Nation..... | 101 |
| Figure 3.31 | Localisation des marqueurs mitochondriaux humains détectés dans le bassin versant de la rivière South Nation..... | 102 |
| Figure 3.32 | Localisation des marqueurs mitochondriaux porcins détectés dans le bassin versant de la rivière South Nation..... | 103 |
| Figure 3.33 | Localisation des marqueurs mitochondriaux de bœuf détectés dans le bassin versant de la rivière South Nation..... | 104 |
| Figure 3.34 | Localisation des marqueurs mitochondriaux de chèvre détectés dans le bassin versant de la rivière South Nation..... | 105 |
| Figure A.1 | Alignement des séquences amplifiées par les amorces consensuelles et spécifiques chez les espèces animales sélectionnées..... | A-2 |

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

- ADN : Acide désoxyribonucléique
ADN-ase : Désoxyribonucléase
ADNmt : Acide désoxyribonucléique du génome mitochondrial
ARN : Acide ribonucléique
RNase : Ribonucléase
ARNr : Acide ribonucléique des ribosomes
ARNt : Acide ribonucléique de transfert
ATP : Adénosine triphosphate
BVRA : Bassin versant de la rivière l'Assomption
BVRSN : Bassin versant de la rivière South Nation
CARA : Corporation de l'aménagement de la rivière l'Assomption
dNTP : Désoxyribonucléoside triphosphate
GITC : Guanidine isothiocyanate
INRS-IAF : Institut Armand-Frappier de l'Institut national de la recherche scientifique
IRB-CNRC : Institut de recherche en biotechnologie du Centre national de recherches Canada
ITS : Espaceur transcrit interne
MRC : Municipalité régionale de comté
nPCR : Réaction de polymérisation en chaîne nichée
Pb : Paire de bases
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PVPP : polyvinylpolypyrrolidone
qPCR : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
RT-PCR : Réaction de transcription inverse suivie d'une polymérisation en chaîne
SNP : Polymorphisme mononucléotidique
Sp. : Espèce
T_a : Température d'appariement
T_m : Température de dénaturation
UFC : Unité formant colonie
UTN : Unités de turbidité néphélométrique
UV : Ultraviolet

INTRODUCTION

La stratégie de gestion intégrée de l'eau par bassin versant est de plus en plus appliquée au Canada, notamment dans les provinces du Québec et de l'Ontario. Les organismes responsables des bassins versants ont plusieurs mandats dont celui d'assurer le suivi régulier de la qualité des eaux du territoire. La contamination fécale des eaux de surface peut avoir des impacts considérables sur l'environnement, la santé publique et l'économie. Aussi, elle représente un enjeu de taille pour les gestionnaires de l'eau en raison des difficultés liées à l'évaluation du niveau de pollution ainsi qu'à la réhabilitation des eaux affectées. Il existe une multitude d'indicateurs microbiens ou non-microbiens permettant d'estimer ou de quantifier le degré de contamination fécale. Certains indicateurs sont d'ailleurs l'objet de recommandations gouvernementales précises qui visent à faciliter l'évaluation de la situation et à initier le processus décisionnel menant à la mise en place de mesures correctives. Toutefois, pour orienter les stratégies de gestion et de réhabilitation des cours d'eau présentant une contamination fécale récurrente, il est nécessaire d'en identifier la source. Jusqu'à maintenant, plusieurs indicateurs ont été proposés pour déterminer la source animale d'une contamination fécale mais aucun ne s'est avéré assez performant pour être adopté par les autorités responsables de la qualité des eaux. Il y a quelques années, le laboratoire du professeur Richard Villemur a proposé l'utilisation de l'ADN mitochondrial comme marqueur spécifique d'espèce dans le cadre du dépistage des sources de contaminations fécales en eaux de surface. Ce choix s'appuyait majoritairement sur les caractéristiques propres au génome mitochondrial telles que l'évolution de sa séquence, son abondance dans les cellules et dans les fèces animales et son historique d'utilisation comme marqueur spécifique d'espèce. De plus, les travaux accomplis jusqu'à maintenant ont permis de démontrer la spécificité, la sensibilité et la faisabilité de notre approche.

Le présent projet s'est intéressé à la mise au point d'une nouvelle méthodologie d'amplification nPCR à haut débit permettant le suivi des marqueurs mitochondriaux pour quatorze espèces animales et à son application à l'étude des sources de

contamination fécale récurrente dans des bassins versants. Une collaboration avec la Corporation de l'aménagement de la rivière l'Assomption a permis d'appliquer notre méthode à l'analyse des eaux de surface d'une cinquantaine de sites situés dans son bassin versant qui regroupe à la fois des zones urbaines, agricoles et boisées susceptibles d'être contaminées par les humains, les animaux d'élevages ou encore la faune sauvage. En parallèle, Agriculture et Agroalimentaire Canada a lancé le programme *Watershed Evaluation of Beneficial Management Practices*. Une série de projets de recherche ont alors été entrepris pour évaluer la qualité microbiologique des eaux du BVRSN et caractériser l'aménagement du territoire (Lyautey *et al.* 2007; Ruecker *et al.* 2007; Wilkes *et al.* 2009; Lyautey *et al.* 2010). L'un des projets en cours proposait d'utiliser des données de qualité de l'eau et des banques de souches bactériennes pour identifier les relations entre les sources de pollution fécales, l'aménagement du territoire et l'hydrologie. Quoique nous ne nous soyons pas intéressés à ces problématiques, la méthode développée dans le cadre du présent projet de maîtrise fut aussi appliquée aux échantillons d'un des volets de cette étude.

En résumé, ce projet consistait à déterminer la source de contamination fécale d'eaux de surface échantillonnées à différents sites du bassin versant de la rivière l'Assomption et du bassin versant de la rivière South Nation. Il fut proposé que l'application de l'étude à l'échelle d'un bassin versant, le criblage des marqueurs mitochondriaux d'une grande variété d'espèces animales ainsi que l'augmentation du débit de la méthode de détection permettraient d'améliorer l'identification et le suivi des sources de contamination fécale dans les eaux de surface. Après avoir mis au point une méthodologie d'amplification nPCR à haut débit spécifique à quatorze espèces animales, nous avons été en mesure d'en évaluer la sensibilité, la spécificité et la pertinence dans le cadre de l'analyse d'échantillons témoins générés en laboratoire ainsi que d'échantillons d'eaux de surface correspondant à un large spectre de taux de contamination fécale.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Les bassins versants

1.1.1 La gestion intégrée de l'eau par bassin versant

Historiquement, les politiques de gestion de l'eau ont été adoptées en fonction des frontières administratives et sectorielles (Brun 2009). Toutefois, depuis une vingtaine d'années, on observe à l'échelle internationale une tendance à tenir compte des facteurs environnementaux et humains qui influencent l'ensemble des eaux de surface d'un même bassin versant. Un bassin versant inclut toutes les eaux de surface étant drainées vers un même cours d'eau, ce qui constitue une unité spatiale qui se distingue aussi par son couvert végétal, sa géologie, ses sols, sa topographie et son aménagement (Smith et Smith 2003). Le concept de gestion intégrée de l'eau par bassin versant existait déjà depuis une soixantaine d'années et il est maintenant défini comme étant un processus qui promeut le développement de la gestion coordonnée de l'eau, des terres et des ressources associées de façon à maximiser les bienfaits économiques et sociaux équitablement et sans compromettre la durabilité des écosystèmes vitaux (Biswas 2004).

Ce modèle de gestion est appliqué dans plusieurs provinces canadiennes. Par exemple, l'Ontario compte 36 sociétés d'aménagement chargées d'assurer la conservation, la restauration et la gestion de l'eau, des terres et des habitats naturels (Conservation Ontario 2009). C'est toutefois au Québec que le concept a été le plus formalisé, grâce à l'adoption de la Politique nationale de l'eau en 2002 (Brun 2009). Cette politique encadre la mise en place d'organismes de bassin versant responsables d'assurer la concertation entre tous les usagers et gestionnaires de l'eau du territoire via la réalisation d'un plan directeur de l'eau (Gangbazo 2004). Parmi les nombreux enjeux proposés, on retrouve le suivi régulier de la qualité des eaux, ce qui implique la détection de la contamination fécale. Lorsque plusieurs sources de pollution ponctuelles et diffuses sont présentes dans un bassin versant, le choix des mesures d'atténuation doit être basé sur des informations significatives à propos des sources, des pathogènes et des risques pour la

santé de façon à bien évaluer les compromis à faire en regard des coûts de gestion, des bénéfices pour la santé et des impacts environnementaux et économiques (Jenkins *et al.* 2009). La caractérisation des sources de pollution fécale dépend nécessairement de l'expertise et des technologies disponibles. C'est pourquoi les gestionnaires des bassins versants de la rivière l'Assomption et de la rivière South Nation collaborent de plus en plus avec les chercheurs dans le but de développer des outils d'analyse novateurs leur permettant d'améliorer les méthodes d'évaluation, de suivi et de restauration de la qualité des eaux de surface.

1.1.2 Le bassin versant de la rivière l'Assomption

Le bassin versant de la rivière l'Assomption (BVRA) est situé au Canada dans la province de Québec et occupe majoritairement la région administrative de Lanaudière ainsi qu'une portion des Laurentides. Il couvre le territoire étant drainé par la rivière l'Assomption et ses tributaires pour se déverser dans le fleuve Saint-Laurent (Figure 2.4). L'aménagement de ce territoire de 4 220 km² comprend des zones forestières (71 %) principalement situées au nord dans le plateau laurentien et le piedmont des Laurentides ainsi que des zones agricoles (29 %) surtout localisées au sud dans la plaine du Saint-Laurent (CARA 2006).

En 1997, le territoire du BVRA comptait plus de 150 000 résidents et une population saisonnière d'environ 45 500 visiteurs (Ministère de l'Environnement et de la Faune 1997). Différents facteurs anthropiques exercent une pression sur l'environnement de la région sud du BVRA. D'abord, l'étalement urbain vers la deuxième et la troisième couronne de la métropole entraîne une haute densité de population (MAPAQ 2002). En effet, le nombre d'habitants par km² augmente selon l'axe nord-sud formé par les municipalités régionales de comté de Matawinie (10), Montcalm (60), Joliette (130), Rivière du Nord (200) et L'Assomption (400) (MAPAQ 2002). Aussi, la plaine du Saint-Laurent présente un sol fertile et un climat propice aux activités agricoles. En 1997, les productions animales recensées

comptaient 73 564 unités dont le porc¹ (52 %), le bœuf (26 %) et la volaille (20 %) (Ministère de l'Environnement et de la Faune 1997). Les volailles et les autres animaux élevés dans le BVRA comprennent le poulet, le dindon, l'oie, le faisan, le cheval, le sanglier, le bison, le vison, le daim et le cerf (MAPAQ 2008). La densité de la population humaine et l'industrie agricole du sud sont susceptibles d'être à la source de la pollution récurrente des eaux de surface. Il est d'ailleurs reconnu que l'aspect inesthétique et la mauvaise qualité de l'eau offerte dans la portion sud du BVRA limitent considérablement la pratique des usages associés au milieu aquatique (MENVIQ 1999).

1.1.3 Le bassin versant de la rivière South Nation

Le bassin versant de la rivière South Nation (BVRSN) est situé au Canada dans la province de l'Ontario. Il couvre une superficie d'environ 3 900 km² dont les eaux s'écoulent dans la rivière South Nation et ses tributaires en confluence avec la rivière des Outaouais (Figure 2.5). L'aménagement du territoire est surtout dédié à l'agriculture et à l'élevage (60%) mais comporte aussi des régions urbaines, rurales et sauvages (Lyautey *et al.* 2010). Le BVRSN inclut une quinzaine de municipalités qui comptent un total d'environ 125 000 habitants dont la densité de population varie de 8 à 354 personnes par km² (O'Grady 2008; Parker *et al.* 2008). On y retrouve 16 étangs d'épuration dont 14 sont municipaux et 2 sont liés à l'industrie laitière (O'Grady 2008). La réglementation provinciale ontarienne permet la décharge des effluents de ces étangs lors des débits de pointe, surtout au printemps (O'Grady 2008). C'est d'ailleurs typiquement au printemps et à l'automne que l'épandage de fumier est effectué sur les terres agricoles de cette région (Lyautey *et al.* 2007). En 2008, le recensement des élevages des comtés du BVRSN (Prescott-Russell, Leeds-Grenville et Stormont-Dundas-Glengarry) a évalué la population animale à environ 178 100 bœufs, 53 400 porcs et 20 550 moutons (MAAARO 2010). Il est reconnu que la qualité de l'eau du BVRSN est réduite dans plusieurs secteurs et continue d'être affectée par les pressions agricoles et urbaines, notamment via la contamination fécale des ressources en eau (Agriculture et Agroalimentaire Canada 2008).

¹ Dans le texte, puisque certaines espèces animales n'ont pas de nom commun épiciène, la mention du mâle fait également référence à la femelle et au petit, et *vice-versa*. Par exemple, « le porc » inclut aussi la truie et le porcelet.

1.2 La contamination fécale des eaux de surface

1.2.1 Causes et conséquences

Différentes situations sont à l'origine de la contamination d'une eau de surface par des matières fécales provenant de l'humain, des animaux domestiqués ou des animaux sauvages. Par exemple, on identifie souvent des sources ponctuelles ayant une localisation précise et fixe comme c'est le cas des effluents de stations de traitement des eaux usées domestiques ou industrielles, des systèmes de refoulement des eaux de pluie ou encore des sites d'enfouissement des déchets (Ritter *et al.* 2002; Santo Domingo et Ashbolt 2008). Dans un bassin versant, les sources ponctuelles de microorganismes pathogènes sont plus faciles à trouver et à contrôler que les sources diffuses (Brion et Lingireddy 1999; Jamieson *et al.* 2004). Les sources diffuses ne pouvant pas être localisées sont notamment les fuites des systèmes septiques et des canalisations d'égouts, le lessivage suite à l'épandage d'engrais agricoles à base de purin ou encore les excréments d'animaux de compagnie, domestiqués ou sauvages rejetés à proximité ou dans les cours d'eau (Simpson *et al.* 2002b; Santo Domingo et Ashbolt 2008).

Puisque les eaux de surface sont communément utilisées pour les usages récréatifs et commerciaux, l'ingestion non intentionnelle d'eau contaminée par des matières fécales peut représenter un risque pour la santé publique (Ahmed *et al.* 2009b). Les maladies d'origine hydrique se manifestent le plus souvent par des troubles gastro-intestinaux de courte durée mais peuvent aussi avoir des effets graves, chroniques ou même mortels chez les personnes sensibles (Santé Canada 2006). À grande échelle, une épidémie sera déclarée si plusieurs personnes partageant un lien épidémiologique ou ayant été exposées à la même eau sont infectées par un même agent pathogène. Au Québec, 43 épidémies de maladies infectieuses d'origine hydrique ont été signalées entre janvier 2005 et janvier 2008 (INSPQ 2009). Les voies d'exposition incluaient l'eau de consommation (29/43), les activités récréatives en spa ou à la plage (12/43) et le contact de personne à personne associé à l'eau (2/43). Notons qu'à peine plus de la moitié de ces épidémies ont été l'objet d'une analyse d'eau ou d'échantillon biologique (29/43) et qu'une faible proportion seulement a mené à l'identification d'un microorganisme pathogène (6/29) ou à la détection d'un indicateur de contamination fécale (8/29) (INSPQ 2009). D'ailleurs, l'origine la plus souvent

suspectée pour ces éclosions était la contamination fécale par une installation septique (7/43) (INSPQ 2009). Quoique la confirmation d'un agent pathogène nécessite l'analyse d'échantillons biologiques, il s'avère que le dépistage d'indicateurs de contamination fécale dans l'eau représente aussi une approche intéressante.

1.2.2 Les indicateurs de la contamination fécale

Comment savoir si une eau de surface a été contaminée par des microorganismes pathogènes d'origine fécale ? En dépit des avancées de la biologie moléculaire, il semble que les méthodes conventionnelles de microbiologie encore utilisées aujourd'hui nécessitent trop de ressources en expertise, temps et argent pour permettre le dépistage systématique de tous les microorganismes pathogènes potentiellement présents dans les eaux de surface. De plus, le fait que ces microorganismes soient relâchés de façon intermittente dans les fèces des animaux porteurs rend leur distribution inégale et leur concentration relativement faible dans les eaux contaminées. À l'opposé, les bactéries commensales sont largement et abondamment distribuées dans la flore intestinale des vertébrés à sang chaud et constituent de bons candidats pour détecter une contamination fécale (Wilkes *et al.* 2009). Plusieurs caractéristiques ont été proposées afin de définir l'indicateur idéal (Bonde 1966; Santé et Bien-être social Canada 1992). En plus d'être quantifiable de façon simple, sécuritaire et abordable, un tel indicateur doit permettre une grande sensibilité de détection en étant présent dans les fèces à une concentration plus élevée que les microorganismes pathogènes. Pour éviter les faux résultats négatifs, il doit être plus persistant dans l'environnement et résistant à la désinfection que les microorganismes pathogènes. À l'opposé, pour éviter les faux résultats positifs, il doit être absent des eaux non contaminées et incapable de se développer dans le milieu aquatique. Idéalement, la densité de l'indicateur devrait présenter une corrélation directe avec le taux de contamination fécale et avec l'occurrence de maladies d'origine hydrique. Jusqu'à maintenant, il n'a pas été démontré de façon satisfaisante qu'un seul indicateur de contamination fécale soit en mesure de répondre à tous ces critères (Yates 2007). Comme l'ont récemment rappelé Payment et Locas, puisque plusieurs microorganismes pathogènes d'importance pour la santé publique ne se comportent pas comme les

microorganismes indicateurs fécaux et qu'il n'y a toujours pas d'indicateur absolu de leur présence, les indicateurs actuels ne donnent seulement qu'une probabilité de leur cooccurrence (Payment et Locas 2010). Néanmoins, la qualité des eaux de surface est régulièrement évaluée à l'aide de différents indicateurs microbiens et non microbiens.

Au Canada, les microorganismes indicateurs recommandés pour la surveillance systématique de la qualité des eaux utilisées à des fins récréatives sont les entérocoques en eaux marines et *Escherichia coli* en eaux douces. Quoique *E. coli* soit considéré comme un indicateur plus spécifique de contamination fécale que les coliformes thermotolérants (Santé Canada 2009), ces derniers ont déjà été inclus dans les recommandations canadiennes (Santé et Bien-être social Canada 1992).

Le groupe des coliformes est très diversifié et se compose majoritairement de membres de la famille des Enterobacteriaceae (Rompre *et al.* 2002). D'un point de vue morphologique, il s'agit de bacilles non sporulants et Gram-négatifs (Prescott *et al.* 2003). Qu'elles soient aérobies ou anaérobies facultatives, ces bactéries possèdent une enzyme β -galactosidase qui leur permet de fermenter le lactose à 35°C (INSPQ 2003b). Cette caractéristique est généralement vérifiée par la technique des membranes filtrantes incubées sur un milieu différentiel de type Endo contenant du lactose, par le test de fermentation à tubes multiples ou encore par la méthode des substrats définis de Colilert (Rompre *et al.* 2002; INSPQ 2003b; Prescott *et al.* 2003; Santo Domingo et Sadowsky 2007). Les coliformes totaux sont utilisés comme indicateurs de pollution de l'eau depuis la fin du 19^{ème} siècle (INSPQ 2003b) mais ils se sont avérés trop ubiquitaires dans l'environnement pour être réellement spécifiques à une contamination fécale (Edberg *et al.* 2000; INSPQ 2003b; Tallon *et al.* 2005). Cette spécificité est néanmoins observée chez le sous-groupe des coliformes dits thermotolérants qui sont capables de se multiplier et de fermenter le lactose à la température plus restrictive de 44,5°C. Il semble que 80 % à 90 % des coliformes thermotolérants ayant une origine fécale appartiennent à l'espèce *Escherichia coli* qui est maintenant reconnue comme étant très spécifique à la contamination fécale (INSPQ 2003a). Son identification est généralement effectuée en repiquant des colonies issues des tests de détection des coliformes thermotolérants ou encore en procédant directement à des tests enzymatiques spécifiques qui vérifient la présence de β -glucuronidase et l'absence d'uréase (Ashbolt *et al.* 2001; INSPQ 2003c). Parmi les autres microorganismes ayant déjà été

proposés pour indiquer une contamination fécale on retrouve notamment les Enterococci, les Streptococci fécaux, *Clostridium perfringens*, les Clostridia sulfito-réducteurs, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et certains bactériophages (Lemarchand *et al.* 2004; Tallon *et al.* 2005).

Dans tous les cas, il est important de sélectionner un indicateur approprié au type de suivi auquel il sera appliqué. Par exemple, une étude de l'occurrence des microorganismes pathogènes dans les eaux de surface du fleuve Saint-Laurent par Payment *et al.* a inclus différents indicateurs bactériens de contamination fécale dont les coliformes totaux, les coliformes thermotolérants et *Clostridium perfringens* (Payment *et al.* 2000). Dans le cas des eaux de surface du BVRSN, une étude de trois ans a confirmé que le groupe des coliformes thermotolérants et l'espèce *Escherichia coli* sont les indicateurs les plus appropriés pour y prédire la présence ou l'absence de bactéries et parasites pathogènes (Wilkes *et al.* 2009). Une autre étude menée auprès de 26 laboratoires effectuant quotidiennement les méthodes de membrane filtrante, de fermentation à tubes multiples et de substrats définis a révélé que la variabilité entre laboratoires était faible en comparaison avec celle liée à la méthode et à son exécution (Griffith *et al.* 2006). Fait intéressant, la plus importante source de variabilité fut attribuée aux erreurs commises lors de l'entrée de données. Ces indications appuient l'importance de développer des méthodes d'analyse qui soient simples et qui permettent de vérifier l'occurrence d'erreurs à chaque étape.

Il est important de noter que le suivi des eaux de surface peut aussi faire appel à des indicateurs non microbiens. Ceux-ci ne sont pas nécessairement liés à la contamination fécale mais permettent néanmoins de détecter les variations de la qualité de l'eau de façon simple, rapide, relativement peu coûteuse et pouvant être automatisée (Payment *et al.* 2003). Les principaux indicateurs hydrologiques et physicochimiques sont les précipitations, le débit, la coloration de l'eau, le pH, la conductivité, la turbidité, la granulométrie, la caractérisation des particules solides ainsi que la mesure des matières organiques, des désinfectants résiduels et de l'ammonium (Payment *et al.* 2003).

1.2.3 L'analyse des indicateurs microbiens par biologie moléculaire

Tel que mentionné précédemment, il n'existe toujours pas d'indicateur idéal pour faire le suivi de la contamination fécale. Les microorganismes indicateurs et les méthodes d'analyse adoptés par la législation sont souvent critiqués quant aux problèmes de spécificité, aux délais encourus ainsi qu'aux biais apportés par la perte de viabilité entre l'échantillonnage et le décompte, par les cellules viables mais non cultivables et par l'inhibition de croissance (Bej *et al.* 1990).

Depuis plus d'un quart de siècle, la détection de marqueurs génétiques dans les échantillons environnementaux a été grandement facilitée par le développement et l'optimisation des méthodologies de biologie moléculaire comme la réaction en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction* ou PCR), la fluorescence d'anticorps (*antibody fluorescence*), la cytométrie de flux et la séparation immunomagnétique (Lee *et al.* 2010). Grâce au perfectionnement de la PCR quantitative, celle-ci fut souvent proposée comme alternative aux méthodes de culture utilisées pour la surveillance des coliformes et des bactéries pathogènes entériques dans l'eau. Les premières applications ciblaient les gènes *lacZ* et *lamB* qui encodent respectivement l'enzyme β -galactosidase des coliformes et la protéine de transport du maltose de *Escherichia coli* (Bej *et al.* 1990). Dès lors, l'approche fut critiquée en raison des problèmes de spécificité des amorces proposées, de l'inhibition enzymatique associée aux échantillons environnementaux et de l'amplification de l'ADN des bactéries mortes qui ne devraient pas être considérées dans ce type d'analyse (Fricker et Fricker 1994; Rompre *et al.* 2002). Néanmoins, l'amélioration des méthodologies de préparation de l'ADN et l'utilisation d'azoture d'éthidium pour discriminer l'ADN provenant de cellules viables ou non viables (Rudi *et al.* 2005) devraient permettre aux chercheurs d'atténuer ces difficultés et de poursuivre la recherche de régions spécifiques au génome des microorganismes indicateurs ou pathogènes. Par exemple, la bactérie *Escherichia coli* fut ciblée via les gènes *Uida* (Bej *et al.* 1991; Fricker et Fricker 1994; Juck *et al.* 1996; Maheux *et al.* 2009) et *UidR* (Bej *et al.* 1991) de la β -glucoronidase, le gène *gadAB* de la glutamate décarboxylase (McDaniels *et al.* 1996; Grant *et al.* 2001), le gène *lacY* de la lactose perméase (Horakova *et al.* 2008), le gène *phoE* qui encode une protéine de la membrane externe (Spierings *et al.* 1993), le gène de l'ARNr bactérien 16S (Tsen *et al.* 1998) ou la région ITS adjacente (Khan *et al.* 2007), le gène *cyd* du complexe cytochrome bd (Horakova *et al.* 2008) ou encore le gène *tuf* du facteur d'élongation Tu (Maheux *et al.*

2009). Il est important de mentionner que certaines amorces conçues spécifiquement pour cibler *E. coli* sont aussi spécifiques à d'autres genres comme *Shigella sp.* et au moins une espèce de *Salmonella* en raison de leur similarité génétique (Horakova *et al.* 2008; Maheux *et al.* 2009).

1.2.4 Les recommandations gouvernementales

Au Canada, des limites maximales tolérables ont été établies pour la plupart des contaminants potentiellement nocifs pouvant affecter la santé de l'eau des écosystèmes aquatiques (INRE 2009). Les différentes normes sont adaptées au type d'eau, à son usage et à la méthodologie de détection qualitative ou quantitative du polluant. Par exemple, pour la contamination fécale des eaux douces récréatives, les recommandations peuvent tenir compte de la relation entre les indicateurs microbiens et les données épidémiologiques relatives à l'incidence de maladies gastrointestinales associées à la natation (Santé Canada 2009). Dans le cas du présent projet de recherche, le décompte des coliformes thermotolérants a été utilisé comme indicateur quantitatif de la contamination fécale des eaux de surface de bassins versants situés au Québec et en Ontario. Quelles sont les législations et recommandations qui encadrent la problématique étudiée ?

Les critères de qualité de l'eau de surface au Québec sont élaborés par le ministère québécois du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs en se basant majoritairement sur ceux provenant d'organismes faisant autorité dans le domaine (MDDEP 2009). Le taux de coliformes thermotolérants ne doit pas excéder 1000 UFC / 100 ml dans les eaux utilisées pour des activités récréatives de contact secondaire (pêche sportive, canotage). Pour la protection des activités de contact primaire (natation, planche à voile), ce critère est ajusté à un maximum de 200 UFC / 100 ml. Au cours des dernières années, plusieurs provinces canadiennes ont abandonné les coliformes thermotolérants comme indicateurs bactériologiques au profit de *E. coli* (Brouillette 2010). Quoiqu'il s'agisse d'un indicateur de contamination fécale plus spécifique, les concentrations maximales de *E. coli* recommandées par Santé Canada sont similaires aux critères québécois cités précédemment (Santé Canada 2009).

Lorsque ces normes ne sont pas respectées, la contamination est susceptible d'être assez importante pour véhiculer des microorganismes pathogènes fécaux présentant un

risque inacceptable pour la santé des utilisateurs de l'eau de surface. Pour être en mesure d'élaborer des stratégies de réhabilitation des cours d'eau problématiques, les gestionnaires et les scientifiques ont besoin d'un indicateur spécifique d'espèce leur permettant d'identifier directement l'espèce animale qui est à l'origine de la contamination et, indirectement, de cibler l'activité qui cause la contamination.

1.3 Détermination de la source de contamination fécale

Le contrôle des sources de contamination fécale dans les eaux de surface est important pour aider les gestionnaires de l'eau à rencontrer les objectifs et les critères de qualité fédéraux, provinciaux ou municipaux. De plus, en comparaison avec les méthodes et les indicateurs traditionnels, cette approche fournit un portrait plus complet de l'utilisation du territoire et des dommages environnementaux associés à la libération de matières fécales dans un bassin versant (Jenkins *et al.* 2009). Depuis le début des années 2000, ce domaine de recherche suscite beaucoup d'intérêt et amène de plus en plus de laboratoires à développer des approches innovatrices pour identifier l'espèce animale étant à l'origine d'une contamination. Cela se voit notamment par la multitude de publications scientifiques qui ont pour objet la recherche des sources de contamination fécale (Figure 1.1) ou encore par l'émergence de laboratoires d'analyse spécialisés dans ce domaine (p. ex. la Source Molecular Corporation). Différents degrés de discrimination sont possibles en différenciant une source humaine ou non-humaine, en considérant des catégories d'animaux (animaux domestiqués, faune sauvage) ou encore en ciblant des espèces ou des individus précis (USEPA 2005). L'expression anglaise *microbial source tracking* est très répandue puisque que la majorité des marqueurs spécifiques sont des indicateurs microbiens. Néanmoins, des marqueurs génétiques propres aux eucaryotes ainsi que diverses substances chimiques ont aussi été proposés pour déterminer l'origine d'une contamination fécale de l'eau.

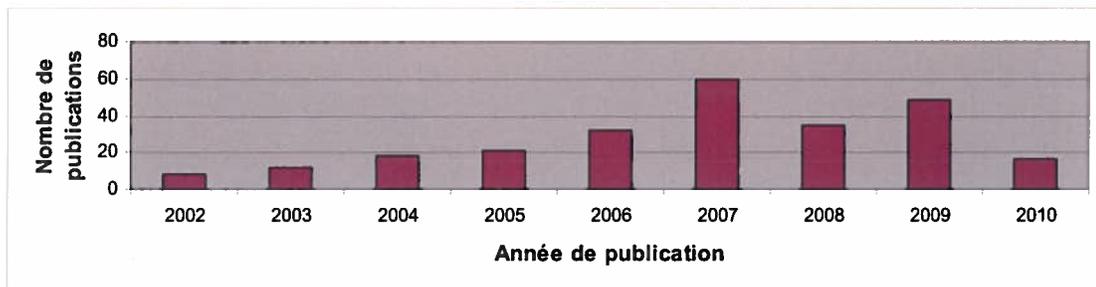


Figure 1.1

Estimation du nombre annuel de publications ayant pour sujet la détermination de la source d'une contamination fécale.

Selon l'analyse des résultats de recherche des mots-clés « source tracking » et « fecal » par l'outil de recherche Web of Science (<http://isiknowledge.com>, consulté le 23 juin 2010).

1.3.1 Les marqueurs spécifiques chimiques

Les eaux usées d'origine humaines peuvent être une importante source de contamination fécale, notamment en raison des bris, fuites ou débordements d'installations septiques. L'alimentation et le mode de vie propres aux populations humaines font en sorte que de nombreux produits chimiques se retrouvent dans les eaux usées domestiques. La recherche de ces substances anthropiques dans une eau de surface permettrait alors de préciser si la contamination fécale a une origine humaine ou non. Par exemple, il peut s'agir de composants alimentaires non assimilés comme la caféine (Scott *et al.* 2002) ou encore de produits métaboliques spécifiques comme les stérols fécaux, les stéanolis fécaux et les acides biliaires (Chaler *et al.* 2001; Glassmeyer *et al.* 2005). Les substances ciblées peuvent aussi provenir des produits d'entretien domestiques qui se retrouvent dans l'eau grise qui est à son tour mélangée à l'eau usée au niveau de la plomberie. Citons par exemple les détergents, les fragrances, les azurants optiques et les tripolyphosphates de sodium (Close *et al.* 1989; Chaler *et al.* 2001; Glassmeyer *et al.* 2005; Cao *et al.* 2009). Des réticences ont été soulevées quant à la spécificité et la sensibilité de détection de ces marqueurs chimiques ainsi qu'à la variabilité de leur biodégradation et de leur adsorption dans l'environnement (USEPA 2005). Aussi, leur détection et leur quantification requièrent habituellement des laboratoires bien équipés et un personnel qualifié (Payment *et al.* 2003).

1.3.2 Les marqueurs spécifiques microbiens

Le tractus intestinal des animaux à sang chaud présente des conditions propices à la colonisation microbienne et ces conditions peuvent varier entre autres selon la diète de l'animal et la prise d'antibiotiques (Russell et Rychlik 2001; Simpson *et al.* 2002a). Ainsi, les matières fécales des différentes espèces animales sont susceptibles de présenter des profils distincts de diversité microbienne incluant des espèces ou des souches pouvant servir de marqueurs spécifiques. Les marqueurs bactériens ayant été proposés peuvent être spécifiquement associés à un hôte animal en se basant sur des caractéristiques phénotypiques ou génotypiques. Pour augmenter la concentration du marqueur dans l'échantillon à analyser, les méthodes peuvent nécessiter la culture des microorganismes ou encore l'amplification d'une cible génétique par PCR. Aussi, certaines méthodes

dépendent d'une banque de matériel microbien, c'est-à-dire que l'identification d'une source se fait en comparant le profil des marqueurs de l'échantillon contaminé avec ceux de bibliothèques élaborées à partir d'échantillons fécaux prélevés directement au niveau des sources présumées de contamination.

Des chercheurs ont proposé d'utiliser des indicateurs traditionnels de la contamination fécale comme l'espèce *Escherichia coli* ou le genre *Enterococcus* et d'en discriminer la source en se basant sur leur profil de résistance antimicrobienne (Graves *et al.* 2007; Servais et Passerat 2009) ou sur leur patron génétique (Dombek *et al.* 2000; Johnson *et al.* 2004; Somarelli *et al.* 2007). Certaines espèces de *Bifidobacterium* seraient spécifiques à l'humain comme *B. adolescentis*, *B. dentium*, *B. longum*, *B. caccae* et *B. catenulatum* ou à certains animaux domestiques (Dorai-Raj *et al.* 2009; Balleste *et al.* 2010; Wery *et al.* 2010). Il en va de même pour certaines espèces de la classe des Bactéroïdales dont la spécificité d'hôte a été déterminée pour diverses espèces ou groupes comme par exemple les ruminants, l'humain, le bœuf, le porc, le chien et la bernache du Canada (Kreider 1998; Bernhard et Field 2000; Kildare *et al.* 2007; Shanks *et al.* 2008; Dorai-Raj *et al.* 2009; Fremaux *et al.* 2009; Harwood *et al.* 2009; Jenkins *et al.* 2009; Shanks *et al.* 2009; Fremaux *et al.* 2010). Des problèmes ont toutefois été soulevés quant au fait que les différences d'anatomie, de physiologie et de diète entre les individus d'une même espèce animale se reflètent par une variation génétique entre les différentes communautés microbiennes fécales (Shanks *et al.* 2007).

Les virus seraient aussi de bons marqueurs de la source d'une contamination fécale en raison de leur spécificité d'hôte, de leur grande stabilité dans l'environnement et de la prévalence élevée de certaines infections virales au sein des populations animales (Hundesha *et al.* 2009). Aussi, leur représentativité d'une contamination fraîche dans de l'eau douce, de mer ou distillée serait similaire à celle des marqueurs bactériens (Ahmed *et al.* 2009a). Dans différentes études, des analyses d'eaux usées par amplification PCR ou RT-PCR ont été en mesure de détecter du matériel génétique de virus spécifiques à l'humain, incluant des entérovirus, le virus de l'hépatite A, des rotavirus, des adénovirus et des polyomavirus (Noble *et al.* 2006; McQuaig *et al.* 2009). D'autres espèces animales ont aussi pu être ciblées par l'intermédiaire de marqueurs viraux comme par exemple les adénovirus spécifiques au porc et les polyomavirus, enterovirus ou teschovirus spécifiques au bœuf (Hundesha *et al.* 2009). Il existe aussi des bactériophages associés à certains indicateurs bactériens

mentionnés précédemment. Par exemple, il semblerait que l'une des approches les plus prometteuses pour différencier les sources de contamination humaines et animales dans l'eau soit le sérotypage et le génotypage de coliphages à ARN F-spécifiques (Friedman *et al.* 2009; Haramoto *et al.* 2009; Skrabber *et al.* 2009). Des réticences ont toutefois été exposées quant à leur persistance qui varierait d'un sérotype à l'autre (Muniesa *et al.* 2009) et qui serait trop stable dans les biofilms (Skraber *et al.* 2009).

1.3.3 Les marqueurs spécifiques eucaryotes

Des parasites eucaryotes relâchés via les fèces d'un animal ont été proposés comme indicateurs spécifiques d'une contamination fécale de l'eau. Le genre *Cryptosporidium* est constitué d'une quinzaine d'espèces incluant plus de 40 génotypes, lesquels seraient spécifiques à certains hôtes (Ruecker *et al.* 2007). Une étude a ainsi été en mesure d'effectuer le génotypage des oocystes de *Cryptosporidium* retrouvés dans les eaux de surface d'un bassin versant pour évaluer l'impact qu'avaient différents animaux sur la qualité de l'eau, notamment l'humain, le bœuf, les oiseaux, le cerf, le rat musqué, le campagnol et d'autres espèces sauvages (Ruecker *et al.* 2007). Le parasite *Giardia* a aussi été proposé comme marqueur spécifique mais les résultats de son génotypage n'ont pas été concluants et son utilisation a été rejetée (Blanch *et al.* 2006).

Toutes ces approches tentent de dépister la présence d'un organisme colonisant spécifiquement un hôte animal. Pourquoi ne pas cibler directement les cellules de cet hôte qui sont exfoliées et excrétées dans les matières fécales à la source de la contamination ? Il y a une dizaine d'années, c'est ce qu'ont tenté le microbiologiste Pierre Payment et le biologiste moléculaire Richard Villemur en proposant d'utiliser le génome mitochondrial comme marqueur génétique spécifique (Martellini *et al.* 2005). Au fil des années, cette approche a été appliquée à l'analyse d'eau de surface, d'eau usée et d'eau de mer par diverses méthodes telles que l'amplification simple ou multiplex par PCR ou qPCR, l'hybridation spécifique sur tache et l'hybridation sur biopuce d'ADN (Martellini *et al.* 2005; Caldwell *et al.* 2007; Schill et Mathes 2008; Baker-Austin *et al.* 2009; Caldwell et Levine 2009; Kortbaoui *et al.* 2009; Baker-Austin *et al.* 2010) (communications personnelles). Dans tous les cas, l'ADNmt s'est avéré être un marqueur spécifique prometteur pour identifier les sources de contamination fécale de façon spécifique et

sensible. Les principales critiques liées à l'utilisation de l'ADNmt comme marqueur spécifique d'espèces dans les échantillons d'eau sont « la survie des gènes eucaryotes dans les eaux naturelles et leur présence potentielle dans les réactifs de PCR » (Santo Domingo et Sadowsky 2007). Ces réticences à propos de l'ADNmt s'atténuent lorsqu'on considère ses caractéristiques fondamentales, ses nombreuses applications biomoléculaires comme marqueur génétique et les résultats des récentes recherches effectuées dans le domaine de la contamination fécale des eaux.

1.4 Utilisation de l'ADN mitochondrial comme marqueur spécifique d'espèce

1.4.1 La mitochondrie et le génome mitochondrial

Les cellules eucaryotes contiennent un ensemble de constituants sub-cellulaires nécessaires au maintien des processus biochimiques. Dans les cellules animales, la mitochondrie assure la fonction de production d'énergie libre sous forme d'ATP par phosphorylation oxydative et est impliquée dans l'apoptose, le vieillissement et certaines pathologies (Boore 1999). Cet organe serait le descendant direct d'un endosymbionte bactérien s'étant établi dans une cellule nucléée à un stade primitif (Gray *et al.* 1999). Tout comme son ancêtre procaryote, la mitochondrie peut se fissionner et possède son propre génome (Clay Montier *et al.* 2009).

La capacité qu'ont les mitochondries de se fissionner et de se fusionner fait en sorte que leur nombre et leur forme varient de façon spectaculaire dans différents types cellulaires et sous différentes conditions physiologiques (Veltri *et al.* 1990; Alberts *et al.* 2004). Par exemple, une étude portant sur différents types de cellules a rapporté une variation allant de 83 à 677 mitochondries par cellules (Robin et Wong 1988).

Les phénomènes de fission et fusion sont bien connus mais la façon dont les molécules d'ADNmt sont choisies pour être répliquées ou dégradées reste incertaine (Clay Montier *et al.* 2009). Dépendamment du degré de fragmentation, on retrouva un nombre variable de copies du génome mitochondrial par organe (Alberts *et al.* 2004). Les valeurs rapportées sont de 0 à 11 copies par mitochondrie (Cavelier *et al.* 2000) ou encore de 220 à 1720 copies par

cellule (Robin et Wong 1988). Il semble en effet que ce nombre peut varier selon le type cellulaire, l'âge ou l'effet d'une maladie (Clay Montier *et al.* 2009).

Même si l'ADN mitochondrial est assez diversifié au sein des eucaryotes, l'organisation du génome mitochondrial est significativement conservée chez les mammifères (Clayton 1992). Il code pour 13 polypeptides participant au système de phosphorylation oxydative, 2 ARNr et 22 ARNt (Gasiev et Shaikhaev 2008) (Figure 1.2). Notons que certaines protéines nucléaires sont encodées par le génome nucléaire puis synthétisées dans le cytoplasme avant d'être transportées jusqu'aux mitochondries (Clay Montier *et al.* 2009). Les progrès du séquençage et de la bioinformatique auront permis de rendre publiques plus de 2 052 séquences complètes du génome mitochondrial animal (Figure 1.3). Il a d'ailleurs été rapporté que le plus petit génome est celui de *Plasmodium falciparum* (6 kpb) alors que les plus grands sont retrouvés dans les plantes terrestres (180-2 400 kpb) (Gray *et al.* 2004). Chez les vertébrés, la taille varie de 14 935 pb (caïman nain de Cuvier) à 25 972 pb (gecko épineux de Bineo) en passant par les 16 569 pb de l'humain (NCBI 2010).

Le génome mitochondrial est un excellent outil de biologie moléculaire étant donné l'étendue des connaissances acquises au cours des trente dernières années à propos de sa structure, de son contenu en gènes, de son organisation et de son expression. Aussi, comparativement à l'ADN nucléaire, l'ADN mitochondrial serait une meilleure source de marqueurs génétiques spécifiques en raison de sa plus grande abondance, de son faible contenu en nucléotides intergéniques non codants, de son absence de recombinaison, de la prédominance de l'hérédité maternelle et de son taux de mutation relativement plus élevé (Gray *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2007; Fujimura *et al.* 2008).

1.4.2 Les utilisations de l'ADN mitochondrial comme marqueur spécifique d'espèce

Les laboratoires de médecine légale effectuent de façon routinière l'analyse de l'ADNmt pour déterminer ou prouver l'origine des échantillons retrouvés sur les lieux d'un crime. Le nombre élevé de copies par cellule compense pour la faible concentration en ADN de certains échantillons vieillis ou dégradés (Jobling et Gill 2004). Il a été démontré *in situ* que des pièces à conviction comme des empreintes digitales, des accessoires, des

cheveux et des poils contiennent significativement plus de copies détectables d'ADN mitochondrial que nucléaire (Andersson *et al.* 2006). De plus, la variabilité du génome mitochondrial permet une identification précise allant jusqu'au niveau de l'individu. Quoique la plupart des cas de médecine légale concernent l'humain, des méthodes d'analyse biomoléculaires ont aussi été développées pour pouvoir identifier de quelle espèce animale provient l'ADNmt, tout particulièrement dans les cas de braconnage (Parson *et al.* 2000; Guha et Kashyap 2005; Teletchea *et al.* 2005; Karlsson et Holmlund 2007).

Dans l'industrie agroalimentaire, l'analyse par amplification PCR est actuellement la méthode la plus communément utilisée pour s'assurer que la nourriture et la moulée sont exemptes de certaines viandes animales (Walker *et al.* 2003). Par exemple, on peut détecter des marqueurs mitochondriaux provenant du porc, du bœuf, du mouton, du coq, du bison, de l'émeu, de la baleine ou de certains poissons (saumon, maquereau, hareng, morue, thon) (Meyer et Candrian 1996; Montiel-Sosa *et al.* 2000; Lahiff *et al.* 2001; Fujimura *et al.* 2008) ou encore pour prévenir la falsification dans l'étiquetage des viandes de gibier d'importation (Fajardo *et al.* 2007; Ballin *et al.* 2009; Rojas *et al.* 2010).

Les biologistes ont grandement bénéficié de l'analyse des variations de séquence de l'ADNmt. Plusieurs études de phylogénie et de phylogéographie s'en servent pour mieux comprendre l'évolution et la classification des espèces animales (Hofreiter *et al.* 2001; Bruford *et al.* 2003; Ludt *et al.* 2004). Sur le terrain, l'étude des populations animales implique que les individus dénombrés soient adéquatement identifiés en utilisant préférentiellement une méthode qui n'entraîne pas de stress ou de blessure chez l'animal. La possibilité d'identifier un individu à partir de l'ADNmt extrait de ses poils est donc un avantage supplémentaire de ce marqueur (Oliveira *et al.* 2007). Au niveau du laboratoire, une autre application pratique est la possibilité de déterminer si les lignées de cultures cellulaires d'espèces différentes ont subi des contaminations croisées (Cooper *et al.* 2007; Ono *et al.* 2007).

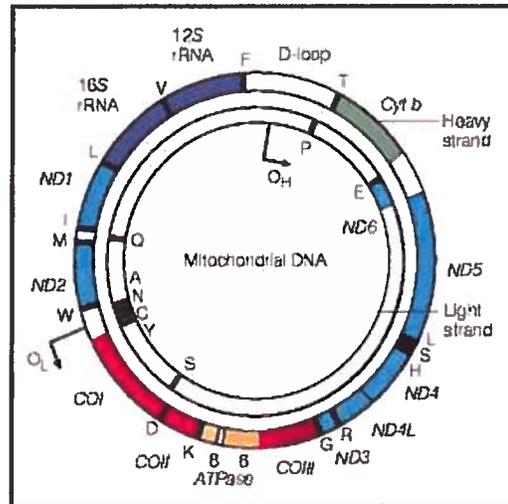


Figure 1.2
Le génome mitochondrial humain.
 (Taylor et Turnbull 2005)

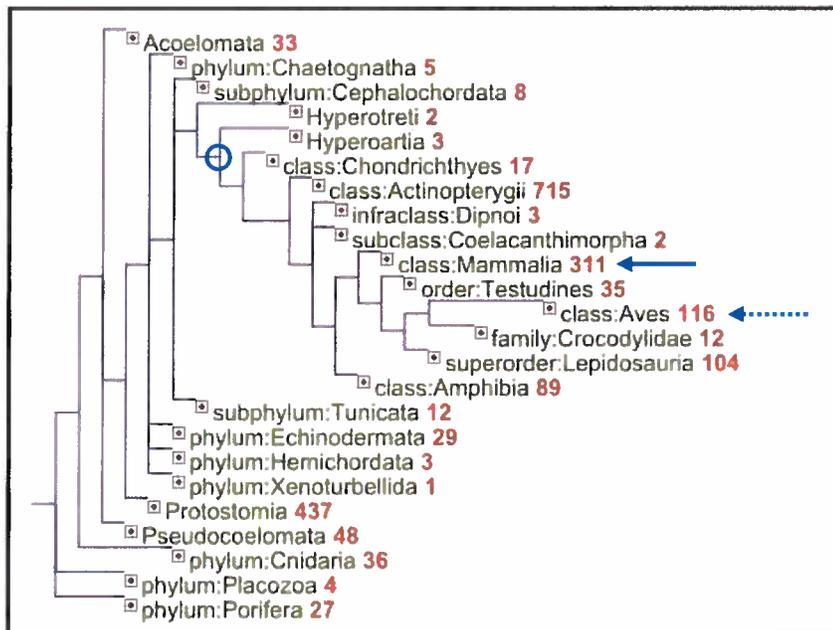


Figure 1.3
Arbre taxonomique des séquences disponibles du génome mitochondrial animal complet.

La base de données « Organelle Genome Ressources » contenait au moins 2052 séquences associées au règne animal (Metazoa). Plusieurs centaines correspondaient aux organismes du sous-branchement des vertébrés (encerclé) dont ceux de la classe des mammifères (Mammalia, flèche pleine) et de la classe des oiseaux (Aves, flèche hachurée). (NCBI 2010)

1.4.3 L'ADN mitochondrial dans les fèces

Tel qu'expliqué précédemment, certains chercheurs ont utilisé l'ADNmt comme marqueur génétique spécifique de l'hôte responsable d'une contamination fécale des eaux de surface. En effet, les cellules épithéliales intestinales d'un animal et l'ADNmt qu'elles contiennent peuvent se retrouver dans les fèces qu'il rejette. Les fèces sont une des sources majeures de produits d'excrétion des animaux et elles sont constituées d'un mélange de résidus d'aliments non digérés, de microorganismes, de sécrétions endogènes et de composants cellulaires exfoliés du tractus gastro-intestinal (Iyengar *et al.* 1991). Il a été démontré qu'un nombre significatif de cellules épithéliales terminales différenciées du colon sont récupérables à partir de fèces humaines fraîches avec des rendements de 1 à 20 millions de cellules par gramme (Iyengar *et al.* 1991; Albaugh *et al.* 1992; Gireesh *et al.* 2004; Kamra *et al.* 2005). Ces cellules sont continuellement excrétées dans le lumen, entraînant un taux de renouvellement rapide estimé à 5 jours chez l'humain (de Lau *et al.* 2007; Verstappen *et al.* 2009).

Est-ce que l'ADN mitochondrial détecté dans l'eau de surface provient nécessairement des matières fécales de l'hôte ? Il semblerait que oui, quoique tout est question de proportions et de facteurs de dilution. Par exemple, il a été démontré que l'ADNmt de la viande de bœuf consommée par des humains était parfois détectable dans leurs fèces (Caldwell *et al.* 2007). Un même phénomène aurait été observé en analysant des fèces canines qui contenaient vraisemblablement une quantité trace de marqueur mitochondrial spécifique au coq (Schill et Mathes 2008). Néanmoins, dans ces deux cas, l'ADNmt résiduel des aliments était retrouvé en concentrations significativement inférieures à celles de l'ADNmt de l'hôte. Évidemment, l'eau peut être le vecteur d'autres sources de cellules animales comme par exemple les cellules épithéliales libérées dans la salive des troupeaux venus s'y abreuver, celles des baigneurs et des animaux aquatiques qui y nagent ou encore les cellules résultantes de la décomposition d'un cadavre.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Préparation des échantillons

2.1.1 Échantillonnage

2.1.1.1 *Tissus animaux*

Les tissus animaux de porc, bœuf, mouton, chèvre, coq, cheval, dinde, caille, cerf rouge, caribou, autruche et émeu provenaient d'une boucherie ou d'une épicerie. Les tissus de goéland à bec cerclé, goéland argenté et goéland marin provenaient du centre québécois sur la santé des animaux sauvages de la Faculté de médecine vétérinaire de St-Hyacinthe (André D. Dallaire, DMV, M.Sc., DACVP). Les tissus ont été congelés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ avant d'être découpés en cubes d'environ 0,2 g à l'aide d'un scalpel nettoyé au savon puis à l'éthanol. Les tissus découpés ont été conservés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans des microtubes 1,5 ml. Les cellules humaines étaient des neuroblastomes LAN5 issus de passages cellulaires et fournis par Marc Desforges Ph.D., de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Les cellules ont été culotées dans un tube Falcon™ de 15 ml (*BD Labware, Franklin Lakes, NJ, É.-U.*), congelées à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis conservées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.1.2 *Eaux usées*

L'échantillon d'eau usée de la station d'épuration de Rosemère-Lorraine (Figure 2.1) a été récolté le 28 juillet 2009 (Figure 2.2) à l'aide d'un échantillonneur constitué d'une perche attachée à une bouteille de plastique. Une bouteille stérile de polyéthylène de quatre litres (*Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, É.-U.*) a été remplie avec plusieurs prélèvements successifs effectués au niveau des dessableurs, en aval du traitement des dégrilleurs mécaniques. Le dégrilleur est une sorte de peigne actionné mécaniquement qui enlève les débris s'accumulant sur les grilles alors que le dessableur permet l'élimination du sable et d'autres matières beaucoup plus lourdes que l'eau.

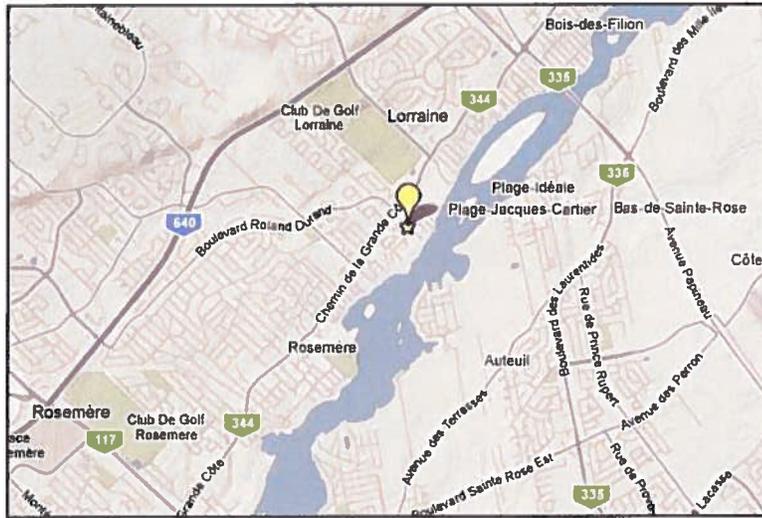


Figure 2.1
Station de traitement des eaux usées de Rosemère-Lorraine.
 (Google Maps, <http://maps.google.ca>, 2010)

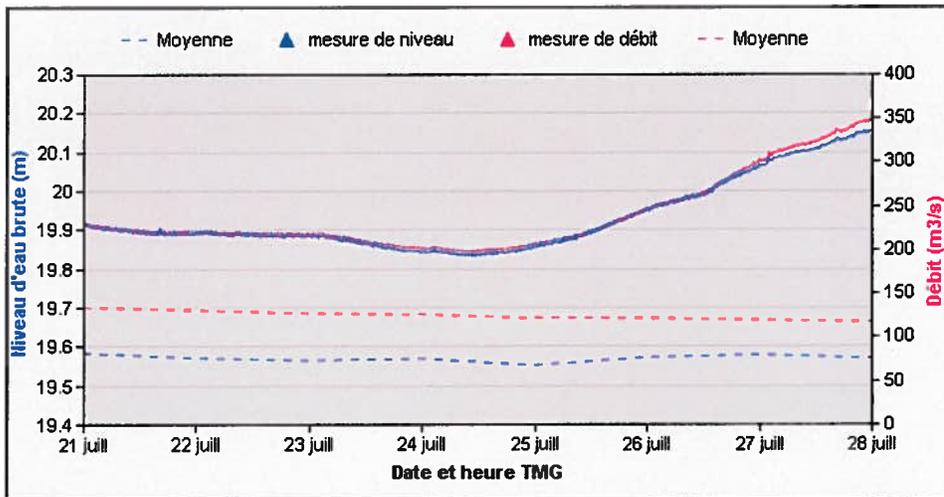


Figure 2.2
Niveau d'eau brute et débit de la rivière des Mille-Iles.
 Station fédérale numéro 02OA003 durant la semaine précédant l'échantillonnage du 28 juillet 2009. (Environnement Canada, données préliminaires non-vérifiées, <http://www.wsc.ec.gc.ca/hydat/H2O>, 2010)

2.1.1.3 Eaux de surface

L'échantillonnage du bassin versant de la rivière South Nation et du bassin versant de la rivière l'Assomption ont respectivement été accomplis par les laboratoires d'Agriculture et Agroalimentaire Canada et de l'INRS-IAF. Dans les deux cas, les échantillons d'eau de surface ont été conservés dans une glacière puis dans une chambre froide à 4 °C jusqu'au moment de leur filtration, soit moins de 24 heures plus tard.

Les échantillons d'eau de surface du bassin versant de la rivière l'Assomption au Québec (Figure 2.4) ont été prélevés à l'aide d'un échantillonneur contenant une bouteille stérile de polyéthylène de 1000 ml (*Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, É.-U.*) (Figure 2.3). À chaque station d'échantillonnage, un premier prélèvement d'eau a été transvidé dans une bouteille stérile de polyéthylène de 250 ml (*Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, É.-U.*) dans le but d'en faire le décompte de coliformes thermotolérants et la mesure de la turbidité. Le deuxième prélèvement d'eau de 1000 ml était dédié aux analyses biomoléculaires. En présence d'un pont, l'échantillonnage a toujours été fait en amont pour éviter le biais créé par l'accumulation de la matière organique sous la structure.

Le bassin versant de la rivière South Nation en Ontario (Figure 2.5) a été échantillonné par Agriculture et Agroalimentaire Canada selon leurs instructions permanentes d'opération. L'eau de surface a été prélevée à l'aide d'une perche à laquelle fut attachée une bouteille stérile de polyéthylène de 1000 ml. Généralement, quatre bouteilles étaient ainsi remplies à chaque site d'échantillonnage.



Figure 2.3
Échantillonneur d'eau
de surface.

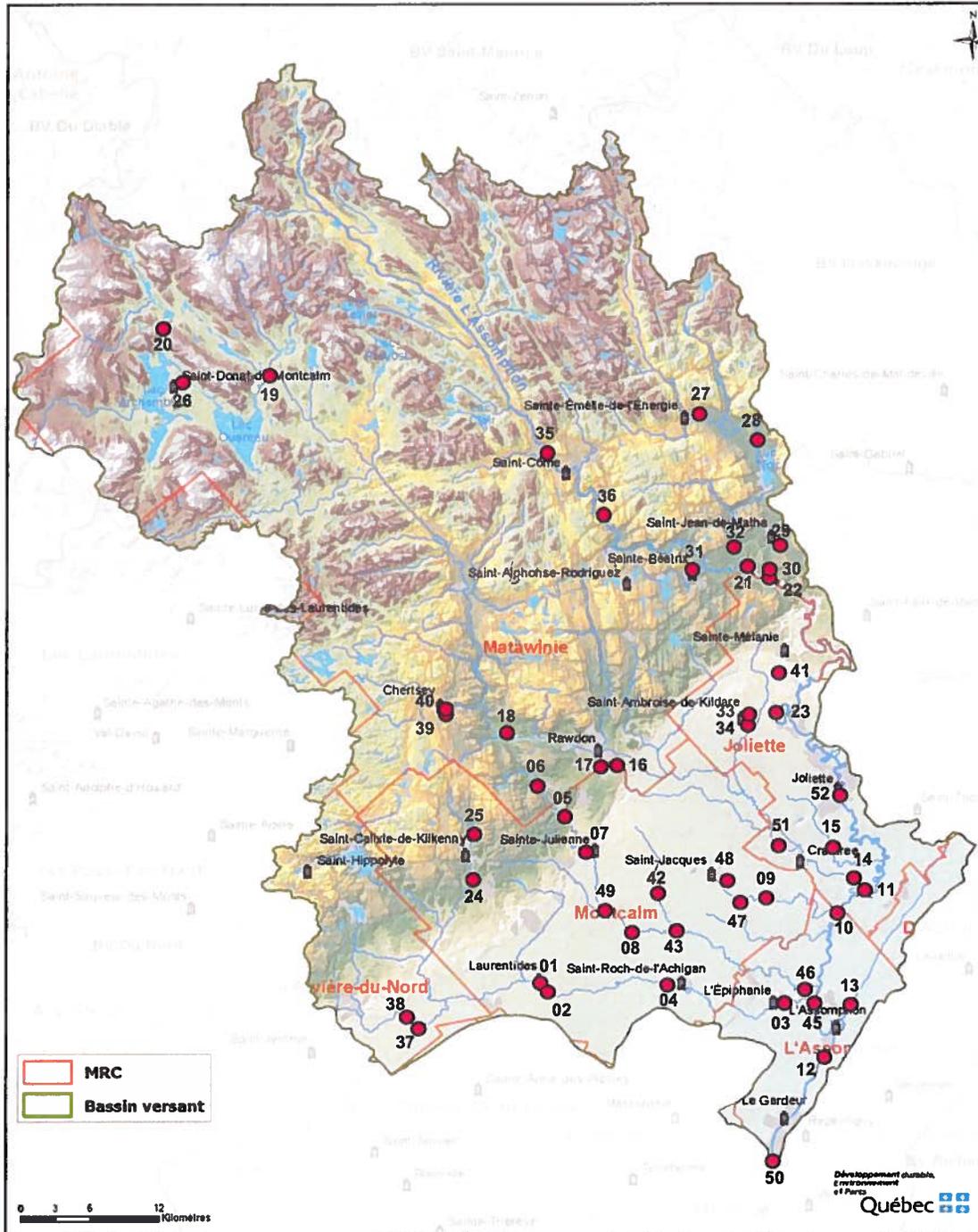


Figure 2.4

Stations d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption.

Le territoire couvre les coordonnées géographiques de 73°17' à 74°25' de longitude ouest et de 45°43' à 43°36' de latitude nord. (Adaptée de Développement durable, Environnement et Parcs Québec et de la Corporation d'aménagement de la rivière l'Assomption, <http://www.cara.qc.ca/territoire/territoire.html>)

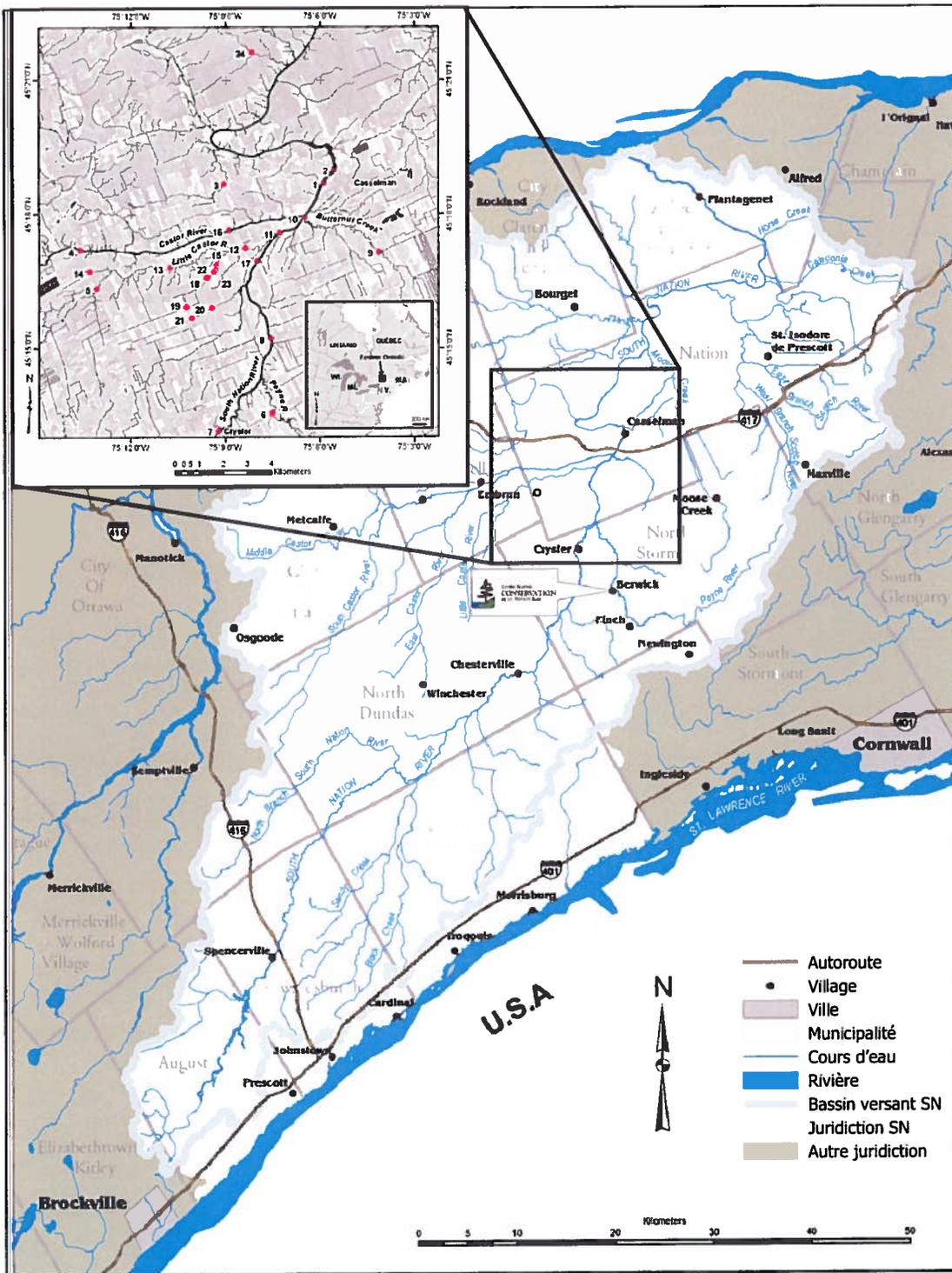


Figure 2.5
Stations d'échantillonnage du bassin versant de la rivière South Nation.
 (Adapté de South Nation Conservation Authority, <http://www.nation.on.ca/en/about-us/watershed-maps>)

2.1.2 Filtration de l'eau

L'assemblage de filtration comprenait une rampe de filtration à six supports et entonnoirs, un flacon d'aspiration et une pompe à vide électrique (Figure 2.6). L'appareillage et les instruments susceptibles d'entrer en contact avec l'échantillon d'eau ont préalablement été stérilisés à l'autoclave ou flambés à l'éthanol. Chaque échantillon d'eau a été filtré sur une membrane stérile de porosité 0,45 μm et de diamètre 47 mm (Millipore, Billerica, MA, É.-U.) jusqu'à saturation ou jusqu'à un volume d'environ 500 ml. Avec des pinces stérilisées, le filtre a été récupéré, enroulé sur lui-même, inséré dans un microtube vissé de 2 ml puis conservé sur glace jusqu'au moment de l'entreposage à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Chaque entonnoir ou support stérilisé à l'autoclave était utilisé pour un échantillon seulement et a été rincé avec de l'eau ultrapure entre les réplicats. L'eau ultrapure fut obtenue par filtration dans une unité Millipak 40 de porosité 0,22 μm (Millipore, Billerica, MA, É.-U.).

Les échantillons d'eau de surface du bassin versant de la rivière South Nation en Ontario (Figure 2.5) ont été filtrés par Agriculture et Agroalimentaire Canada selon leurs instructions permanentes d'opération. D'abord, les pré-filtres AP15 (Millipore, Billerica, MA, É.-U.) et les filtres 0,45 μm (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, É.-U.) ont été pré-humidifiés par incubation dans 0,5 ml de tampon GITC (5 M guanidine isothiocyanate, 100 mM EDTA et 0.5 % Sarkosyl). Les échantillons présentant des sédiments et des débris ont été pré-filtrés sur membrane. La procédure de filtration était similaire à celle décrite pour les échantillons du bassin versant de la rivière l'Assomption quoique la rampe d'aspiration ne comportait que trois unités de filtration. Ensuite, les pré-filtres et les filtres ont été insérés dans des tubes Falcon™ de 15 ml (BD Labware, Franklin Lakes, NJ, É.-U.) où ils furent saturés de GITC dans une proportion de 1 μl de tampon par 1 ml d'eau filtrée avant d'être incubés au-moins une heure à $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour désactiver les ADN-ases. Les tubes contenant les pré-filtres et les filtres ont été conservés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

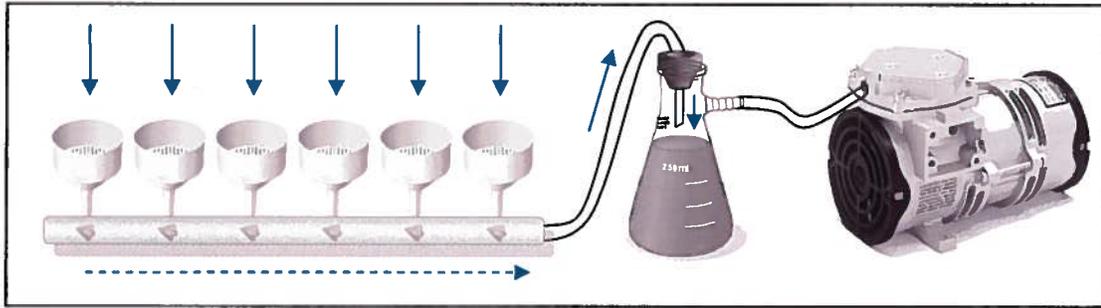


Figure 2.6
Assemblage de filtration des échantillons d'eau.

2.1.3 Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait avec l'ensemble FastDNA Spin (MPbio, Solon, OH, É.-U.) selon le protocole du fabricant. Tel que mentionné précédemment, chaque microtube vissé contenait des billes de verre, une bille de céramique et un filtre ou un tissu animal. L'homogénéisation consistait à y ajouter 1,0 ml de tampon d'extraction (40-50 % urée, 5-10 % Phosphate de sodium monobasique, 1-5 % sodium dodecyl sulfate, 1-5 % DL-dithiothreitol) (MP Biomedicals 2010) puis à agiter 40 secondes à vitesse 6,0 dans un homogénéisateur FastPrep 24 (MPbio, Solon, OH, É.-U.). Après centrifugation 5 minutes à 13 000 x g, le surnageant a été récupéré et mélangé à un volume égal d'une suspension de microbilles de silice (60-70 % guanidine thiocyanate, 10-20 % silice MP) (MP Biomedicals 2010). Une agitation douce de 5 minutes à la température de la pièce a permis à l'ADN présent de s'adsorber aux particules de silice. Ces dernières ont été récupérées par centrifugation 1 minute à 13 000 x g dans un tube contenant une colonne de façon à former une masse compacte de silice renfermant l'ADN et qui fut lavée avec 500 µl d'une solution de lavage (90 % éthanol, 1-3 % tris hydrochloride) (MP Biomedicals 2010). Pour briser les interactions entre les acides nucléiques et la silice, la concentration en sels a été abaissée en humidifiant la colonne avec 100 µl d'eau stérile puis en l'incubant 5 minutes à 55 °C. L'éluat contenant l'ADN extrait a été récupéré par centrifugation 2 minutes à 13 000 x g puis transféré dans des microtubes vissés de 2,0 ml conservés à 4 °C ou -20 °C. L'ADN a été visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose (Section 2.1.6). Les acides nucléiques ont été quantifiés au spectrophotomètre NanoDrop™ ND-1000 (NanoDrop products, Wilmington, DE, É.-U.) en mode *Nucleic acids DNA-50*. La spectrophotométrie a aussi été

utilisée pour évaluer la présence d'acides humiques co-extraits. Puisque les acides humiques absorbent les longueurs d'ondes de 340 nm, on a considéré qu'une purification supplémentaire était nécessaire si le produit d'extraction présentait une A_{340} supérieure ou égale à 0,2 avant correction bichromatique.

L'ADN des échantillons d'eau de surface du bassin de la rivière South Nation a été extrait par les laboratoires d'Agriculture et Agroalimentaire Canada selon leurs instructions permanentes d'opération. L'ensemble DNeasy Blood & Tissue (*Qiagen, Mississauga, ON, CA*) a été utilisé selon les instructions du fabricant en impliquant toutefois l'utilisation d'une rampe d'aspiration QIAvac 24 Plus et des VacConnectors (*Qiagen, Mississauga, ON, CA*), l'omission de la protéinase K et un volume d'élution finale de 100 μ l. Les produits d'extraction d'ADN ont été conservés dans des microtubes stériles de 1,5 ml à -20°C ou -80°C . Cet ADN n'a pas été visualisé ou quantifié.

2.1.4 Purification de l'ADN

Des colonnes de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ont été fabriquées au laboratoire selon des protocoles décrits dans la littérature (Holben *et al.* 1988; Berthelet *et al.* 1996). Le PVPP a d'abord été lavé à l'acide en l'incubant à température pièce dans une solution de HCl 3 M pendant 12 à 16 heures avec agitation. Il fut ensuite filtré sous vide avec un entonnoir Büchner et un papier filtre de cellulose de porosité 11 μ m (*Whatman, GE Healthcare, Springfield Mill, Royaume-Uni*) pour se débarrasser des particules trop fines. Le rétentat a été neutralisé en l'incubant avec agitation dans un tampon potassium phosphate 0,05 M à pH 7,4. Lorsque la suspension a atteint la neutralité à pH 7,0, le PVPP a été filtré à nouveau, pesé puis mis en suspension dans de l'eau ultrapure stérile dans une proportion de 20 % (m/v). Environ 1,2 ml de cette suspension fut compactée dans une colonne de centrifugation de 0,8 ml (*Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, É.-U.*) à 13 000 x g pendant 1 minute de façon à obtenir une masse dense de PVPP. Les colonnes ainsi fabriquées ont été stérilisées à l'autoclave. Juste avant l'emploi, les colonnes de PVPP étaient conditionnées avec 500 μ l d'eau stérile. Chaque produit d'extraction d'ADN a été déposé sur une colonne de PVPP et centrifugé 5 minutes à 13 000 x g pour finalement en

recueillir le filtrat purifié. L'eau ultrapure fut obtenue par stérilisation à l'autoclave, filtration sur membrane 0,22 µm et stérilisation finale à l'autoclave.

2.1.5 Amplification PCR du gène de l'ARN ribosomal 16S

Pour s'assurer que les produits d'extraction ne contenaient pas d'inhibiteurs enzymatiques, des amplifications PCR ont été effectuées avec des amorces s'hybridant à des séquences hautement conservées du gène de l'ARNr 16S bactérien, soit les amorces 27f-YM et 1541r (Tableau 2.IX).

Les réactifs et les conditions d'amplification PCR étaient similaires à ceux qui furent utilisés ultérieurement lors du protocole de détection des marqueurs mitochondriaux. Le mélange réactionnel contenait 1 X de tampon Phusion™ HF (*Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, É.-U.*), 200 µM de chaque dNTPs (*Invitrogen, Carlsbad, CA, É.-U.*), 0,5 µM de chaque amorce (*Alpha DNA, Montréal*), 1 U d'ADN polymérase Phusion™ Hot Start I (*Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, É.-U.*) et le volume réactionnel était complété à 48 µl avec de l'eau ultrapure stérile. Le mélange réactionnel a été distribué dans une plaque Thermowell™ GOLD de 96 puits (*Corning, Corning, NY, É.-U.*) avant d'y ajouter 2,0 µl de produit d'extraction d'ADN. Pour éviter l'évaporation, la plaque a été recouverte d'une pellicule adhésive MicroAmp™ (*Applied BioSystems, Foster City, CA, É.-U.*) et centrifugée brièvement à 2000 x g. Les cycles de température ont été effectués dans un thermocycleur GeneAmp™ PCR System 2700 (*Applied BioSystems, Foster City, CA, É.-U.*) ou TGradient (*Biometra, Goettingen, Allemagne*). Le programme de températures comprenait une dénaturation initiale de 3 minutes à 98 °C suivie de 40 cycles de 10 secondes à 98 °C, 30 secondes à 60 °C et 60 secondes à 72 °C et une élongation finale de 10 minutes à 72 °C.

2.1.6 Électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'extraction d'ADN et les produits d'amplification par PCR ont été visualisés par l'électrophorèse de 5 µl à 10 µl des produits réactionnels sur un gel de 1,5 % à 2,0 % d'agarose ultrapure (*Invitrogen, Carlsbad, CA, É.-U.*) dans un tampon TAE 1 X (Tris-HCl 40 mM, acide acétique 40 mM, EDTA 1 mM). Les tampons de chargement préparés

au laboratoire (30 % v/v glycérol dans H₂O) contenaient du xylène cyanol ou du bleu de bromophénol. Les marqueurs de poids moléculaire utilisés étaient soit l'ADN du phage Lambda digéré par l'enzyme *StyI* (*Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada*), soit le exACTGene™ Mid Range Plus DNA Ladder (*Fisher BioReagents, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,  .U.*) (**Figure 2.7**). Les gels ont été colorés puis décolorés par incubations successives dans une solution de bromure d'éthidium (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,  .U.*) puis dans de l'eau ultrapure   température pièce et avec agitation. Les gels ont été visualisés et photographiés sous rayons ultraviolets avec un système d'imagerie AlphaImager™ 3400 (*Cell Biosciences, Santa Clara, CA,  .U.*).

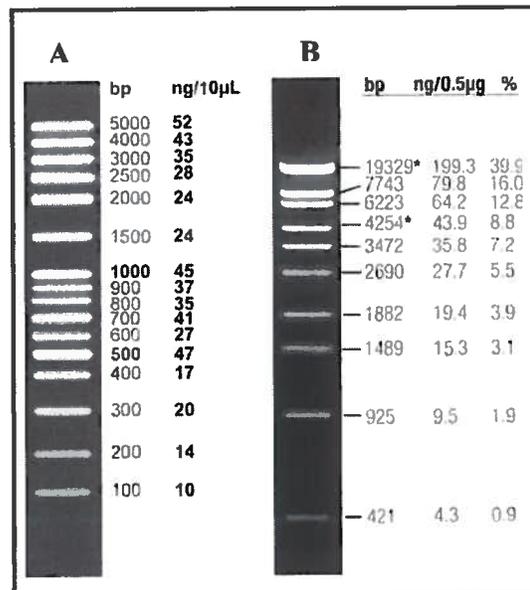


Figure 2.7
Marqueurs de poids moléculaire d'ADN.
 Produit de digestion *StyI* de l'ADN lambda/Eco130I (A) et exACTGene™ Mid Range Plus DNA Ladder (B).

2.2 Décompte des coliformes thermotolérants

Pour chaque échantillon d'eau de surface prélevé dans le bassin de la rivière l'Assomption, un volume de 250 ml a été consacré à la mesure de la turbidité et au décompte de coliformes thermotolérants par les techniciens du laboratoire du Pr. Pierre Payment de l'INRS-IAF. La turbidité a été mesurée par un turbidimètre 2100N (*Hach, Loveland, CO, É.-U.*). Le décompte de coliformes thermotolérants sur membrane filtrante était effectué en conditions stériles et respectait le protocole recommandé par l'Association américaine de santé publique (APHA *et al.* 2005). Des volumes de 50 ml et 5 ml de chaque échantillon ont été filtrés en simplicata sur membrane stérile de porosité 0,45 µm (*Millipore, Billerica, MA, É.-U.*). Les filtres ont été incubés individuellement sur milieu solide m FC Agar (*Difco, BD, Sparks, MD, É.-U.*) (Tableau 2.1) pendant 24±2 heures à 44,5±0,2 °C. Les coliformes thermotolérants ont généré des colonies bleutées qui furent comptées à l'œil nu. En favorisant un décompte significatif qui ne présente pas d'inhibition de croissance, les résultats considérés provenaient alternativement d'une filtration de 50 ml ou de 5 ml.

Le décompte des coliformes thermotolérants des échantillons du bassin versant de la rivière South Nation a été effectué par les laboratoires d'Agriculture et Agroalimentaire Canada selon leurs instructions permanentes d'opération.

Tableau 2.1
Composition du milieu de culture m FC Agar

| Constituants | Concentration (g/L) |
|--------------------------|----------------------------|
| Tryptose | 10,0 |
| Proteose peptone No. 3 | 5,0 |
| Extrait de levure | 3,0 |
| Lactose | 12,5 |
| Sels biliaires No. 3 | 1,5 |
| Chlorure de sodium, NaCl | 5,0 |
| Aniline blue | 0,1 |
| Agar | 15,0 |

2.3 Amplification PCR consensuelle de l'ADN mitochondrial animal

2.3.1 Conception et validation *in silico* des amorces consensuelles

Les amorces consensuelles ont été conçues par Minh Vuong de l'Institut de recherche en biotechnologie du Conseil national de recherches Canada (IRB-CNRC). La conception de cette paire d'amorces avait pour but d'amplifier une région précise du génome mitochondrial de plus d'une cinquantaine d'espèces animales différentes dans le cadre de la mise au point d'une biopuce de détection spécifique de l'ADNmt. Cette conception a aussi tenu compte de la température de dénaturation, des structures secondaires et de la taille de l'amplicon généré. Au moment de l'adoption de ces amorces pour le présent projet de maîtrise, les premiers essais de Minh Vuong avaient démontré que la paire d'amorces MI50 permettait d'amplifier par PCR l'ADNmt de l'humain, du porc, du bœuf et du coq (résultats non publiés).

La validation *in silico* de ces amorces s'est fortement inspirée de la stratégie de conception de Minh Vuong. Ainsi, les séquences du génome mitochondrial de plus de 50 espèces animales (Tableau 2.II) ont été téléchargées (NCBI 2010) puis alignées avec l'application web Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Les alignements ont été visualisés avec le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.9.0 (Hall 1999). En plus de confirmer que les régions de l'alignement correspondant aux amorces ne présentaient pas de polymorphisme nucléotidique, celles-ci ont été analysées par l'application web Basic Local Alignment Search Tool version 2.2.23, pour s'assurer de leur conservation (BLAST 2010). Ce programme permettait de comparer une séquence nucléotidique avec celles des bases de données du NCBI pour localiser les similitudes en se basant sur des calculs statistiques (Altschul *et al.* 1997). Il a été utilisé pour identifier les espèces animales dont le génome mitochondrial contient les séquences ciblées par les amorces consensuelles (Tableau 2.III). Les paramètres de recherche par défaut ont été ajustés pour utiliser la banque de données de séquences génomiques de référence « refseq_genomic », sélectionner le programme optimisé pour la recherche de séquences courtes, inclure les organismes vertébrés (taxon 7742) et exclure les organismes Actinopterygii (taxon 7898). Notons que le *NCBI taxonomy database* ne fait pas autorité

pour la nomenclature et la classification et que le rapport taxonomique généré présentait des irrégularités. Conséquemment, les taxons attribués aux différents organismes cités dans le rapport taxonomique ont été révisés et regroupés à l'aide de la banque de données de l'Integrated Taxonomic Information System du National Museum of Natural History de Washington, D.C. (ITIS 2010).

Tableau 2.II
Séquences alignées pour la validation *in silico* des amorces consensuelles.

| Nom commun | Nom scientifique | Numéro GenBank |
|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| Ane | <i>Equus asinus</i> | X97337 |
| Autruche | <i>Struthio camelus</i> | AF338715 |
| Boeuf/vache | <i>Bos taurus</i> | AY526085 |
| Brochet | <i>Esox lucius</i> | AP004103 |
| Caille de Chine | <i>Coturnix chinensis</i> | AB073301 |
| Caille du Japon | <i>Coturnix japonica</i> | AP003195 |
| Canard | <i>Aythya americana</i> | AF090337 |
| Caribou | <i>Rangifer tarandus</i> | AB245426 |
| Carpe | <i>Cyprinus carpio</i> | X61010 |
| Cerf rouge | <i>Cervus elaphus</i> | AB245427 |
| Chat | <i>Felis catus</i> | U20753 |
| Cheval | <i>Equus caballus</i> | X79547 |
| Chèvre | <i>Capra hircus</i> | AF533441 |
| Chien | <i>Canis lupus familiaris</i> | U96639 |
| Cobaye | <i>Cavia porcellus</i> | AJ222767 |
| Coq (White Leghorn chicken) | <i>Gallus gallus domesticus</i> | X52392 |
| Corneille | <i>Corvus frugilegus</i> | Y18522 |
| Coyote | <i>Canis latrans</i> | DQ480509 |
| Dinde | <i>Meleagris gallopavo</i> | EF153719 |
| Émeu | <i>Dromaius novaehollandiae</i> | AF338711 |
| Faisan (Burma Red junglefowl) | <i>Gallus gallus spadiceus</i> | AP003321 |
| Faisan (Gray Junglefowl) | <i>Gallus sonneratii</i> | AP006741 |
| Faisan (Green Junglefowl) | <i>Gallus varius</i> | AP003324 |
| Faisan (Indochine) | <i>Gallus gallus gallus</i> | AP003322 |
| Faisan (Java Red junglefowl) | <i>Gallus gallus bankiva</i> | AP003323 |
| Faisan (Sri Lanka Junglefowl) | <i>Gallus lafayettei ceylon</i> | AP003325 |
| Goéland dominicain | <i>Larus dominicanus</i> | AY293619 |
| Hamster | <i>Cricetulus griseus</i> | DQ390542 |
| Hérisson | <i>Erinaceus europaeus</i> | X88898 |
| Huard | <i>Gavia stellata</i> | AY293618 |
| Humain | <i>Homo sapiens</i> | J01415 |
| Lama | <i>Lama pacos</i> | Y19184 |
| Lapin | <i>Oryctolagus cuniculus</i> | AJ001588 |
| Lièvre | <i>Lepus europaeus</i> | AJ421471 |
| Loup | <i>Canis lupus lupus</i> | AM711902 |
| Loup gris | <i>Canis lupus</i> | DQ480505 |
| Morue de l'atlantique | <i>Gadus morhua</i> | X99772 |
| Mouse | <i>Mus musculus domesticus</i> | AB042432 |
| Mouton/agneau | <i>Ovis aries</i> | AF010406 |
| Oie | <i>Anser albifrons</i> | AF363031 |
| Oie du Canada | <i>Branta canadensis</i> | DQ019124 |
| Ombre de fontaine | <i>Salvelinus fontinalis</i> | AF154850 |
| Ours brun | <i>Ursus arctos</i> | AF303110 |
| Ours noir | <i>Ursus americanus</i> | AF303109 |
| Ours polaire | <i>Ursus maritimus</i> | AF303111 |
| Phoque | <i>Phoca vitulina</i> | X63726 |
| Phoque gris | <i>Halichoerus grypus</i> | X72004 |
| Porc | <i>Sus scrofa</i> | AF034253 |
| Rat | <i>Rattus norvegicus</i> | AY172581 |
| Raton laveur | <i>Procyon lotor</i> | AB297804 |
| Renard roux | <i>Vulpes vulpes</i> | AM181037 |
| Saumon de l'atlantique | <i>Salmo salar</i> | U12143 |
| Saumon chinook | <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> | AF392054 |
| Taupe | <i>Chrysochloris asiatica</i> | AB096866 |
| Truite arc-en-ciel | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | L29771 |
| Truite brune | <i>Salmo trutta trutta</i> | AM910409 |

Tableau 2.III
Rapport taxonomique des résultats de BLAST pour les séquences des amorces consensuelles MI50-F et MI50-R.

| Taxon | Niveau taxonomique | Nombre d'occurrences | | Nombre d'organismes | |
|------------------|------------------------|----------------------|--------|---------------------|--------|
| | | MI50-F | MI50-R | MI50-F | MI50-R |
| Vertebrata | Sous- embranchement | 444 | 382 | 173 | 120 |
| Mammalia | Classe | 316 | 257 | 109 | 57 |
| Primates | Ordre | 107 | 85 | 25 | 20 |
| Rodentia | Ordre | 23 | 40 | 12 | 21 |
| Lagomorpha | Ordre | 2 | 0 | 1 | 0 |
| Artiodactyla | Ordre | 53 | 0 | 28 | 0 |
| Cetacea | Ordre | 14 | 0 | 7 | 0 |
| Perissodactyla | Ordre | 15 | 8 | 5 | 4 |
| Carnivora | Ordre | 50 | 16 | 25 | 8 |
| Afrosoricida | Ordre | 2 | 0 | 1 | 0 |
| Sirenia | Ordre | 2 | 0 | 1 | 0 |
| Hyracoidea | Ordre | 2 | 0 | 1 | 0 |
| Didelphimorphia | Ordre | 29 | 15 | 1 | 1 |
| Dasyuromorphia | Ordre | 2 | 4 | 1 | 2 |
| Monotremata | Ordre | 15 | 89 | 1 | 1 |
| Aves | Classe | 90 | 36 | 45 | 18 |
| Galliformes | Ordre | 32 | 8 | 16 | 4 |
| Columbiformes | Ordre | 4 | 4 | 2 | 2 |
| Passeriformes | Ordre | 12 | 4 | 6 | 2 |
| Ciconiiformes | Ordre | 4 | 4 | 2 | 2 |
| Gruiformes | Ordre | 8 | 8 | 4 | 4 |
| Falconiformes | Ordre | 4 | 0 | 2 | 0 |
| Anseriformes | Ordre | 10 | 6 | 5 | 3 |
| Trogoniformes | Ordre | 2 | 0 | 1 | 0 |
| Coraciiformes | Ordre | 4 | 0 | 2 | 0 |
| Cuculiformes | Ordre | 4 | 0 | 2 | 0 |
| Psittaciformes | Ordre | 2 | 0 | 1 | 0 |
| Caprimulgiformes | Ordre | 2 | 0 | 1 | 0 |
| Apterygiformes | Ordre | 2 | 2 | 1 | 1 |
| Reptilia | Classe | 28 | 83 | 14 | 42 |
| Crocodylia | Ordre | 2 | 0 | 1 | 0 |
| Squamata | Ordre | 4 | 67 | 2 | 34 |
| Testudines | Ordre | 22 | 16 | 11 | 8 |
| Amphibia | Classe | 10 | 6 | 5 | 3 |
| Anura | Ordre | 10 | 2 | 5 | 1 |
| Caudata | Ordre | 0 | 4 | 0 | 2 |

2.3.2 Amplification PCR consensuelle

La préparation du mélange réactionnel et les cycles de température étaient similaires à ceux décrits pour l'amplification du gène de l'ARNr 16S (Section 2.1.5) quoique les amorces utilisées fussent MI50-F et MI50-R (Tableau 2.IX). Pour chaque échantillon d'eau de surface, trois produits d'amplification PCR de 50 µl ont été générés puis regroupés en un même volume de 150 µl.

2.3.3 Purification du produit d'amplification PCR consensuelle

Les amplicons générés par l'amplification PCR consensuelle ont été purifiés par ultrafiltration avec une plaque AcroPrep 96 ayant un seuil de coupure de 100 kDa (*Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, É.-U.*) et étant déposée sur une plaque microtest de 96 puits en polystyrène à fond arrondi (*Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne*). Toutes les filtrations ont été effectuées par centrifugations successives de 5 minutes à 500 x g, 1000 x g, 15000 x g, 2000 x g puis 2500 x g jusqu'à ce que le passage du liquide soit complet. La membrane de chaque puits a d'abord été conditionnée avec 50 µl d'eau ultrapure stérile. Chaque produit d'amplification PCR a ensuite été filtré dans des puits respectifs. Comme mesure préventive des pertes, la plaque microtest ayant recueillie le filtrat a été recouverte d'un scellant adhésif en aluminium et conservée à -80 °C. Le rétentat a été remis en suspension dans 150 µl d'eau ultrapure stérile par agitation trois minutes à environ 1000 rpm sur un agitateur de microplaques (*Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada*), puis transféré par pipetage dans une plaque Thermowell™ GOLD 96 (*Corning, Corning, NY, É.-U.*). Ces produits d'amplification purifiés ont été conservés à 4 °C, -20 °C ou -80 °C selon les délais d'analyse.

2.4 Amplification nPCR spécifique de l'ADN mitochondrial animal

2.4.1 Conception des amorces spécifiques

Chaque paire d'amorces spécifiques a été conçue pour s'hybrider à une séquence qui était située dans la région amplifiée par les amorces consensuelles MI50 et qui était

spécifique à une seule espèce animale (ou à un seul genre). Dans le cadre de ce projet, 14 espèces ont été sélectionnées en raison de leur élevage au Québec ou de leur comportement grégaire, ce qui les rendait susceptibles d'être à l'origine d'une contamination fécale des eaux de surface. La conception tenait compte de la séquence d'environ 2 kb du génome mitochondrial qui était délimitée et amplifiée par les amorces MI50-F et MI50-R. La base de données GenBank et l'application web Clustal W ont permis de télécharger et d'aligner ce segment de l'ADNmt de plus de 50 espèces animales (Tableau 2.II) ainsi que des espèces similaires ou apparentées à celle ciblée par chaque paire d'amorces conçue (Tableau 2.IV). Les alignements ont été visualisés avec le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.9.0 (Hall 1999) pour identifier les séquences de 19 à 25 bases présentant le polymorphisme de plusieurs nucléotides par rapport à des espèces différentes ou apparentées.

Le programme BLAST 2.2.23 a été utilisé pour identifier les espèces animales dont le génome mitochondrial contenait les séquences ciblées par les amorces spécifiques. Les résultats considérés sont ceux pour lesquels la séquence de l'amorce correspondait parfaitement à une séquence (occurrence) dans la base de données, c'est-à-dire que tous les nucléotides étaient complémentaires, sans mésappariement ni discontinuité (Tableau 2.V). La démarche était similaire à celle adoptée pour les amorces consensuelles (Section 2.3.1) en n'excluant toutefois pas les organismes Actinopterygii (taxon 7898) et en utilisant la base de données *nr*. Cette dernière regroupait les séquences nucléotidiques des banques GenBank (National Institutes of Health), RefSeq Nucleotides (projet Reference Sequence du NCBI), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Data Bank of Japan) et PDB (dérivée des structures de la Brookhaven Protein Data Bank). Le maximum de résultats générés étant fixé à 100, si le nombre d'occurrences atteignait ce seuil pour un même organisme, il était possible d'obtenir des faux négatifs pour les autres espèces. Pour cette raison, des recherches supplémentaires ont été lancées pour les paires d'amorces HUmito5, POmito5 et BOmito5 en excluant respectivement les organismes *Homo sapiens*, *Sus scrofa* et *Bos taurus*.

Les propriétés de chaque paire d'amorces spécifiques et les possibilités de formation de structures secondaires ont été vérifiées avec la version de démonstration du logiciel AlleleID 6.01 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, É.-U.). Celui-ci a été utilisé pour

calculer la température de dénaturation des amorces (T_m) et l'énergie libre de Gibbs de leurs structures secondaires (ΔG) (Tableau 2.vi). L'algorithme du logiciel a utilisé les formules ci-dessous en considérant que le mélange réactionnel de l'amplification PCR contenait 0,25 nM d'acides nucléiques (C), 3,0 mM d'ions magnésium et 50 mM d'ions monovalents à une température (T) de 25,0°C. La variable C ne correspondait pas à la concentration d'ADN matrice ou d'oligonucléotides mais reflétait plutôt la fluctuation de la quantité du produit d'amplification PCR (Rychlik *et al.* 1990). Les variations d'enthalpie (ΔH) et d'entropie (ΔS) ont été calculées en tenant compte de tous les dinucléotides qui composent la séquence de l'amorce selon la thermodynamique des dix interactions « Watson-Crick DNA nearest-neighbor » (SantaLucia 1998). La variation d'entropie a aussi été corrigée en fonction des concentrations en sels. La constante des gaz (R) est de 1,987 cal/kmol.

$$T_m = \frac{\Delta H}{(\Delta S + R * \ln C)}$$

$$\Delta G = (\Delta H - T) * \Delta S$$

Un ΔG excédant les critères de conception indiquait que les structures secondaires dans l'oligonucléotide étaient assez stables pour entrer en compétition avec son hybridation sur l'ADN matrice (Rychlik *et al.* 1990). Cela pouvait s'avérer particulièrement problématique à l'extrémité 3' de l'amorce puisque c'est à cette portion double brin que se lie l'ADN polymérase.

Tableau 2.IV
Séquences alignées pour concevoir chaque paire d'amorces spécifiques.

| Amorces (Animal) | Séquences ciblées | | Séquences à exclure | |
|---------------------|---------------------|--|-------------------------------|------------|
| | Nom scientifique | GenBank | Nom scientifique | GenBank |
| HUmito5 (Humain) | <i>Homo sapiens</i> | FJ168766.1 AP010837.1 EU725621.2 EU007895.1 EU725620.2 EU130575.2 AF347015.1 | ND | ND |
| POmito5 (Porc) | <i>Sus scrofa</i> | AF034253.1 FJ237003.1 EU333163.1 AM158316.1 | <i>Phacochoerus africanus</i> | DQ409327.1 |

Tableau 2.IV
Séquences alignées pour concevoir chaque paire d'amorces spécifiques.

| Amorces (Animal) | Séquences ciblées | | Séquences à exclure | |
|-------------------------|---------------------------------|--|--|--|
| | Nom scientifique | GenBank | Nom scientifique | GenBank |
| BOmito5 (Bœuf) | <i>Bos taurus</i> | AY526085.1 | <i>Bison bison</i> | EU177871.1 |
| OVmito5 (Mouton) | <i>Ovis aries</i> | AF010406.1 | ND | ND |
| CVmito5 (Chèvre) | <i>Capra hircus</i> | AF533441.1 AJ849535.1 AJ885199.1 AJ630113.1 | ND | ND |
| | <i>Capra falconeri</i> | AY670656.1 AY141133.1 | | |
| | <i>Capra cylindricornis</i> | AF363778.2 | | |
| | <i>Capra sibirica</i> | AF363779.1 | | |
| CKmito5 (Coq) | <i>Gallus gallus</i> | X52392 | ND | ND |
| | <i>Gallus gallus bankiva</i> | AP003323 | | |
| | <i>Gallus gallus gallus</i> | AP003322 | | |
| | <i>G. gallus spadiceus</i> | AP003321 | | |
| | <i>Gallus varius</i> | AP003324 | | |
| | <i>Gallus lafayettei</i> | AP003325 | | |
| | <i>Gallus sonneratii</i> | AP006741 | | |
| DImito5 (Dinde) | <i>Meleagris gallopavo</i> | AJ583549.1 U83741.1 EF153719.1 | <i>Perdix perdix</i> <i>Perdix dauuricae</i> | AF222590.1 AF222589.1 |
| CAmito5 (Caille) | <i>Coturnix japonica</i> | AP003195.2 | <i>Coturnix chinensis</i> | AB073301.1 |
| | <i>Coturnix coturnix</i> | X57245.1 AM902516.1 | <i>Coturnix australis</i> <i>Perdix perdix</i> <i>Perdix dauuricae</i> | AF222574.1 AF222590.1 AF222589.1 |
| CHmito5 (Cheval) | <i>Equus caballus</i> | X79547.1 EU939445.3 EF597513.1 | ND | ND |
| CRmito5 (Cerf rouge) | <i>Cervus elaphus</i> | AB245427.1 AJ885206.1 AJ885205.1 AJ885204.1 | <i>Cervus elaphus yarkandensis</i> <i>Cervus elaphus xanthopygus</i> | DQ191149.1 DQ191145.1 DQ191148.1 DQ191146.1 |
| CBmito5 (Caribou) | <i>Rangifer tarandus</i> | AB245426.1 AY184438.1 AY121989.1 | <i>Odocoileus virginianus</i> | M35874.1 |
| AUmito5 (Autruche) | <i>Struthio camelus</i> | Y12025 X67635 AY239137 AF338715 AF069429 AH007281 | ND | ND |
| EMmito5 (Émeu) | <i>Dromaius novaehollandiae</i> | AF338711.1 AJ002924.1 | ND | ND |
| GOmito6 (Goéland) | <i>Larus delawarensis</i> | Séquençage | ND | ND |
| | <i>Larus argentatus</i> | Séquençage | | |
| | <i>Larus marinus</i> | Séquençage | | |
| | <i>Larus marinus</i> | EF373088.2 | | |
| | <i>Larus occidentalis</i> | DQ674566.1 | | |
| | <i>Larus glaucooides</i> | AF173566.1 | | |
| | <i>Larus canus</i> | X76361.1 | | |
| | <i>Larus atricilla</i> | DQ485795.1 | | |
| | <i>Larus dominicanus</i> | AY293619.1 | | |
| | <i>Larus heermanni</i> | U88012.1 | | |

Tableau 2.V

Rapport taxonomique des résultats de BLAST pour les séquences des amorces spécifiques.

Les séquences des génomes mitochondriaux de la base de données « nr » étant complémentaires à chaque amorce conçue ont été identifiées (organisme) et dénombrées (occurrences) par le programme BLAST. Le nombre d'occurrences par organisme a été limité à 100.

| Cible et nom de l'amorce | Organisme | | Nombre d'occurrences | |
|-----------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------|----------|
| | Nom latin | Nom commun | Amorce G | Amorce D |
| <i>Humain</i> | | | | |
| HUmito5 | <i>Homo sapiens</i> | Humain | 100 | 100 |
| | <i>Gorilla gorilla</i> | Gorille occidentale | 10 | 0 |
| <i>Porc</i> | | | | |
| POmito5 | <i>Sus scrofa</i> | Porc | 100 | 26 |
| <i>Bœuf</i> | | | | |
| BOmito5 | <i>Bos taurus</i> | Boeuf domestique | 96 | 99 |
| | <i>Bos primigenius</i> | Auroch (éteint) | 1 | 0 |
| | <i>Bos javanicus</i> | Banteng | 1 | 1 |
| | <i>Bos indicus</i> | Zébu | 2 | 0 |
| <i>Mouton</i> | | | | |
| OVmito5-G | <i>Ovis arie</i> | Mouton | 23 | 7 |
| | <i>Ovis ammon</i> | Argali | 1 | 1 |
| <i>Chèvre</i> | | | | |
| CVmito5 | <i>Capra hircus</i> | Chèvre domestique | 10 | 6 |
| | <i>Capra falconeri</i> | Markhor | 3 | 0 |
| | <i>Capra sibirica</i> | Yanghir | 1 | 0 |
| | <i>Capra cylindricornis</i> | Chèvre du Caucase oriental | 1 | 0 |
| <i>Coq</i> | | | | |
| CKmito5 | <i>Gallus gallus</i> | Coq Bankiva | 28 | 12 |
| | <i>Gallus sonneratii</i> | Coq de Sonnerat | 2 | 2 |
| <i>Dinde</i> | | | | |
| DImito5 | <i>Meleagris gallopavo</i> | Dindon sauvage | 3 | 1 |
| <i>Caille</i> | | | | |
| CAmito5 | <i>Coturnix coturnix</i> | Caille des blés | 3 | 1 |
| | <i>Coturnix japonica</i> | Caille du Japon | 1 | 1 |
| <i>Cheval</i> | | | | |
| CHmito5 | <i>Equus caballus</i> | Cheval | 6 | 6 |
| <i>Cerf rouge</i> | | | | |
| CRmito | <i>Cervus elaphus</i> | Cerf rouge, cerf élaphe | 6 | 2 |
| | <i>Cervus nippon</i> | Cerf Sika | 0 | 3 |
| | <i>Cervus unicolor</i> | Sambar | 0 | 3 |
| <i>Caribou</i> | | | | |
| CBmito5 | <i>Rangifer tarandus</i> | Caribou, renne | 3 | 2 |
| <i>Autruche</i> | | | | |
| AUmito5 | <i>Struthio camelus</i> | Autruche | 5 | 5 |
| <i>Émeu</i> | | | | |
| EMmito5 | <i>Dromaius novaehollandiae</i> | Émeu | 3 | 3 |
| <i>Goélands et mouettes</i> | | | | |
| GOmito6 | <i>Larus atricilla</i> | Mouette atricille | 2 | 2 |
| | <i>Larus canus</i> | Goéland cendré | 1 | 1 |
| | <i>Larus delawarensis</i> | Goéland à bec cerclé | 1 | 1 |
| | <i>Larus dominicanus</i> | Goéland dominicain | 1 | 2 |
| | <i>Larus glaucooides</i> | Goéland à ailes blanches | 1 | 1 |
| | <i>Larus heermanni</i> | Goéland de Heermann | 1 | 1 |
| | <i>Larus marinus</i> | Goéland marin | 1 | 1 |
| | <i>Larus occidentalis</i> | Goéland d'Audubon | 1 | 1 |
| | <i>Creagrus furcatus</i> | Mouette à queue fourchue | 1 | 0 |
| | <i>Pagophila eburnea</i> | Mouette blanche | 1 | 0 |
| | <i>Rhodostethia rosea</i> | Mouette de Ross | 1 | 0 |
| | <i>Rissa tridactyla</i> | Mouette tridactyle | 1 | 1 |
| | <i>Xema sabini</i> | Mouette de Sabine | 1 | 1 |

Tableau 2.VI
Température de dénaturation et structures secondaires théoriques adoptées par les amorces
consensuelles et spécifiques.

| Cible | Amorces | Différence de température de dénaturation (ΔT_m , °C) | Énergie libre de Gibbs des structures secondaires (ΔG , -kcal/mol) | | |
|---------------------------|-------------------------|--|---|-----------------|-----------------|
| | | | Épingle à cheveux | Homodimère | Hétérodimère |
| <i>Maximum acceptable</i> | <i>Extrémité 3'</i> | 3,0 | 1,0 | 2,0 | 2,0 |
| | <i>Séquence interne</i> | | 2,0 | 3,0 | 3,0 |
| Vertébrés | M150-F | A | 3,4 | 3,4 | A |
| | M150-R | | A | 3,1 | |
| Humain | HUmito5-G | A | A | A | A |
| | HUmito5-D | | A | A | |
| Porc | POmito5-G | A | A | 2,3 (3') | 3,9 (3') |
| | POmito5-D | | 3,4 (3') | 3,4 (3') | |
| Bœuf | BOmito5-G | A | A | 3,4 | A |
| | BOmito5-D | | A | 3,1 | |
| Mouton | OVmito5-G | A | A | A | 3,2 (3') |
| | OVmito5-D | | 3,1 | 3,1 | |
| Chèvre | CVmito5-G | A | A | A | 2,1 (3') |
| | CVmito5-D | | A | A | |
| Coq | CKmito5-G | A | A | 4,3 | 3,2 |
| | CKmito5-D | | 1,8 (3') | A | |
| Dinde | Dlmito5-G | A | A | A | 5,1 (3') |
| | Dlmito5-D | | A | A | |
| Caille | CAmito5-G | A | A | 3,0 | 3,0 (3') |
| | CAmito5-D | | A | A | |
| Cheval | CHmito5-G | A | A | A | A |
| | CHmito5-D | | 1,2 (3') | A | |
| Cerf rouge | CRmito5-G | 3,1 | 1,8 (3') | 2,8 (3') et 3,4 | A |
| | CRmito5-D | | A | A | |
| Caribou | CBmito5-G | A | 1,2 (3') | A | 2,5 (3') et 4,0 |
| | CBmito5-D | | A | A | |
| Autruche | AUmito5-G | A | A | 3,0 | 3,4 |
| | AUmito5-D | | A | A | |
| Émeu | ÉMmito5-G | 3,4 | A | A | A |
| | ÉMmito5-D | | A | A | |
| Goéland | GOmito6-G | A | A | 3,1 | A |
| | GOmito6-D | | A | A | |

A : Acceptable selon les critères de conception du logiciel AlleleID 6.0.

(3') : La structure secondaire est située à l'extrémité 3' de la séquence de l'amorce.

2.4.2 Amplification nPCR spécifique en temps réel

En général, chaque passage au thermocycleur était dédié à la détection de l'ADNmt d'une espèce animale précise par les amorces correspondantes (Tableau 2.IX).

Chaque mélange réactionnel contenait 1 X de PerfeCTa SYBR Green FastMix (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, É.-U.), 0,2 µM de chaque amorce (Alpha DNA, Montréal, Qc, Canada) et était complété à un volume total de 18 µl avec de l'eau ultrapure stérile. Les aliquots de mélange réactionnel ont été distribués dans des tubes de polypropylène de 0,1 ml avant d'y ajouter 2,0 µl de produit de purification de l'amplification PCR consensuelle. Les cycles de température ont été effectués dans un thermocycleur RotorGene™ 6000 contrôlé par ordinateur avec le logiciel Rotor-Gene 1.7.87 (QIAGEN, Germantown, MD, É.-U.). Le programme de températures comprenait une dénaturation initiale de 5 minutes à 95 °C suivie de 35 cycles de 30 secondes à 95 °C, 30 secondes à 55 °C et 30 secondes à 72 °C sans élongation finale. Les produits réactionnels ont été analysés par une courbe de dénaturation de 72 °C à 95 °C. Le système informatique a automatiquement ajusté la sensibilité d'acquisition de la fluorescence et appliqué un filtre digital léger lors de l'analyse des résultats.

2.4.3 Amplification nPCR spécifique conventionnelle

Au cours de l'optimisation de la méthode de détection, l'amplification nPCR n'a pas toujours été effectuée en temps réel. Ce fut le cas dans le cadre des essais de spécificité des amorces spécifiques (section 3.1.2) et d'inhibition par l'ADN matrice non-spécifique (section 3.3).

Le mélange réactionnel contenait 1 X de tampon ThermoPol (New England Biolabs Ltd., Pickering, ON, CAN.), 200 µM de chaque dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, É.-U.), 0,4 µM de chaque amorce (Alpha DNA, Montréal), 2,5 U d'ADN polymérase *Taq* (New England Biolabs Ltd., Pickering, ON, CAN.) et le volume réactionnel était complété à 24 µl avec de l'eau ultrapure stérile. Les aliquots de mélange réactionnel ont été distribués dans des tubes Thermowell™ GOLD de 0,2 ml (Corning, Corning, NY, É.-U.) avant d'y ajouter 1,0 µl de produit d'amplification PCR consensuelle. Les cycles de température ont été effectués dans un thermocycleur

GeneAmp™ PCR System 2700 (*Applied BioSystems, Foster City, CA, É.-U.*) ou TGradient (*Biometra, Goettingen, Allemagne*). Le programme de températures comprenait une dénaturation initiale de 3 minutes à 95 °C suivie de 35 cycles de 45 secondes à 95 °C, 30 secondes à 55 °C et 45 secondes à 72 °C.

2.4.4 Détection du produit d'amplification final par lecture de fluorescence

L'amplification nPCR spécifique a été adaptée pour permettre la détection des produits d'amplification sans nécessiter une analyse en temps réel coûteuse ni procéder à une électrophorèse sur gel d'agarose. Pour ce faire, l'amplification était effectuée avec des réactifs traditionnels dans une plaque multi-puits et une préparation maison de SYBR Green était ajoutée après l'amplification pour mesurer la fluorescence finale par un lecteur de plaques.

Le SYBR Green a été préparé en se basant sur le protocole de Yamaguchi (*Yamaguchi et al. 2002b*). La concentration a toutefois été ajustée à la hausse (20 X au-lieu de 2 X) pour s'assurer que l'intensité de la fluorescence émise était proportionnelle à la quantité d'ADN double brin et non limitée par la quantité de molécules fluorescentes disponibles pour s'y lier. La solution de SYBR Green 20 X a été préparée en diluant 5000 fois le SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain 10 000 X (*Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, É.-U.*) avec un tampon TAE (0,04 M de Tris, 1 mM d'EDTA, pH 7,8).

Le mélange réactionnel contenait 1 X de tampon DyNAzyme II 10X (*New England Biolabs Ltd., Pickering, ON, CAN.*), 200 µM de chaque dNTPs (*Invitrogen, Carlsbad, CA, É.-U.*), 0,2 µM de chaque amorce (*Alpha DNA, Montréal*), 1,2 U d'ADN polymérase DyNAzyme II Hot Start (*New England Biolabs Ltd., Pickering, ON, CAN.*) et le volume réactionnel était complété à 18 µl ou 48 µl avec de l'eau ultrapure stérile. Une plaque pour PCR de 96 puits noire opaque (*ABgene, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, É.-U.*) a été utilisée pour combiner les réactions en mélangeant successivement 40 µl d'huile Vapor-Lock (*Qiagen, Mississauga, ON, CA*), 18 µl ou 48 µl de mélange réactionnel puis 2,0 µl de produit d'amplification PCR consensuelle. Aucune pellicule n'a recouvert la plaque. Les cycles de température ont été effectués dans un thermocycleur TGradient (*Biometra, Goettingen, Allemagne*). Le programme de températures

comprenait une dénaturation initiale de 10 minutes à 94 °C suivie de 35 cycles de 30 secondes à 94 °C, 30 secondes à 55 °C et 30 secondes à 72 °C. Après l'amplification nPCR, chaque produit réactionnel a été supplémenté d'un volume égal (20 µl ou 50 µl) de SYBR Green 20 X puis incubé environ 10 minutes avec agitation douce à la température de la pièce. La fluorescence émise par le SYBR Green dans chaque puits a été quantifiée par Olivier Chambenoît avec l'appareil Fusion dont les filtres d'excitation et d'émission ont respectivement été réglés à 485 nm et 520 nm (*Perkin-Elmer, Waltham, MA, É-U.*). La fluorescence relative a été calculée en divisant la valeur de fluorescence d'une réaction par celle du contrôle négatif. L'amplification a été considérée positive lorsque la fluorescence relative excédait un seuil arbitraire de 3.

2.4.5 Méthode d'amplification nPCR mise au point par Randa Kortbaoui

Certains échantillons d'eau de surface du bassin versant de la rivière l'Assomption ont été analysés en utilisant la méthode de détection spécifique de l'ADNmt développée par Randa Kortbaoui, ancienne étudiante dans le laboratoire du Pr. Villemur (*Kortbaoui et al. 2009*) (Section 3.5.3). Cette méthodologie impliquait une première amplification PCR spécifique dont le produit d'amplification a été utilisé comme ADN matrice dans une deuxième amplification nPCR spécifique. Chaque mélange réactionnel contenait 1 X de tampon ThermoPol (*New England Biolabs Ltd., Pickering, ON, CAN.*), 200 µM de chaque dNTPs (*Invitrogen, Carlsbad, CA, É.-U.*), 0,2 µM de chaque amorce (*Alpha DNA, Montréal*), 2,5 U d'ADN polymérase *Taq* (*New England Biolabs Ltd., Pickering, ON, CAN.*), 2 µl de produit d'extraction ou d'amplicon et le volume a été complété à 25 µl ou 50 µl avec de l'eau ultrapure stérile. Les cycles de température ont été effectués dans un thermocycleur GeneAmp™ PCR System 2700 (*Applied BioSystems, Foster City, CA, É.-U.*) ou TGradient (*Biometra, Goettingen, Allemagne*). Le programme de températures comprenait une dénaturation initiale de 5 minutes à 94 °C suivie d'une incubation de 5 minutes à 55 °C puis de 35 cycles de 2 minutes à 72 °C, 40 secondes à 94 °C et 60 secondes à 55 °C et une élongation finale de 10 minutes à 72 °C. Cette procédure a été suivie pour la première et la deuxième amplification en utilisant les paires d'amorces d'amplification PCR ou nPCR spécifiques conçues par Randa Kortbaoui (Tableau 2.VII).

Tableau 2.VII
Amorces d'amplification PCR et nPCR conçues par Randa Kortbaoui

| Organisme ciblé | Nom de l'amorce | Séquence de l'amorce 5' → 3' | Taille de l'amplicon (pb) |
|------------------------|------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Humain (PCR)</i> | Humito3-G | CCCAACCCGTCATCTACTCT | 718 |
| | Humito3-D | AGGGTGTAGTCATGTTAGC | |
| <i>Humain (nPCR)</i> | HumitoN3-G | CTACTCTACCATCTTTGCAGG | 651 |
| | HumitoN3-D | CGTGGTGCTGGAGTTAAGTTG | |
| <i>Porc (PCR)</i> | Pomito4-G | CCCATTATCTACACTACCCTTATC | 723 |
| | Pomito4-D | TTAGGCTTGTGATGACGGGTAT | |
| <i>Porc (nPCR)</i> | PomitoN4-G | CAGTAATGTCCGGAACCATACTAG | 643 |
| | PomitoN4-D | TGTGGTTGCTGAGCTGTGGATT | |
| <i>Bœuf (PCR)</i> | Bomito2-G | CATAGCAATTGCCATAGTCC | 554 |
| | Bomito2-D | TTTTCGATTGTGCCGGCCGTT | |
| <i>Bœuf (nPCR)</i> | BomitoN2-G | CCCTCTTACTAATTCTAGCTC | 401 |
| | BomitoN2-D | TTAGCACTAGGATGAGGAGA | |
| <i>Mouton (PCR)</i> | Ovmito2-G | GGAACCGTTACCACATGTTAC | 689 |
| | Ovmito2-D | GGCTAGTAGGAAGATTAGGAGAAGA | |
| <i>Mouton (nPCR)</i> | OvmitoN2-G | TACTACTGTTACAGGCATCAG | 370 |
| | OvmitoN2-D | CGTGAAGTTAGTTAGGAGAGTA | |
| <i>Coq (PCR)</i> | Ckmito1-G | ACCCTATTTGACTCCCTCAA | 565 |
| | Ckmito1-D | ATGTCGACCAGGGGTTTATG | |
| <i>Coq (nPCR)</i> | CkmitoN1-G | CCCCACACTAACAAAGCAAT | 381 |
| | CkmitoN1-D | GGTTGTAAGGTGGTCGTGAT | |

2.5 Dilutions des amplicons consensuels

Les étapes de validation ainsi que la préparation de l'ADN matrice du contrôle positif de l'amplification nPCR ont nécessité l'utilisation d'amplicons consensuels générés à partir de l'ADNmt de chaque espèce animale ciblée par l'étude. Une amplification PCR consensuelle a été effectuée à partir de 15 à 150 ng d'ADN total extrait des tissus de chaque espèce animale (Section 2.1.1). Chaque produit d'amplification PCR a été visualisé par électrophorèse de 30 µl sur gel d'agarose 1 % (Section 2.1.6). Les amplicons consensuels ont été récupérés en excisant la bande correspondant à environ 2000 pb puis purifiés avec l'ensemble Wizard™ SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, WI, É.-U.) selon le protocole du fabricant et en utilisant un volume d'élution de 20 µl. Les acides nucléiques purifiés ont été quantifiés au spectrophotomètre NanoDrop™ ND-1000 (NanoDrop products, Wilmington, DE, É.-U.) en mode *Nucleic acids DNA-50*. Les amplicons consensuels de chaque espèce animale ont été dilués à environ 20 ng/µl (10^{10} copies/µl) pour ensuite préparer des dilutions en série 1:10

avec de l'eau ultrapure stérile. L'ADN matrice utilisé comme contrôle positif lors des analyses par amplification nPCR spécifique a été préparé en combinant environ 2×10^8 copies des amplicons consensuels de chaque espèce étudiée et en complétant à un volume final de 200ul d'eau ultrapure stérile.

2.6 Séquençage partiel de l'ADN mitochondrial

Le vétérinaire André D. Dallaire du centre québécois sur la santé des animaux sauvages de la Faculté de médecine vétérinaire de St-Hyacinthe a fourni des tissus de goéland résidents du Québec. L'ADN total a été extrait (Section 2.1.3) à partir de 150 mg de muscle de goéland à bec cerclé (*Larus delawarensis*), de 100 mg de poumon de goéland argenté (*Larus argentatus*) et de 165 mg de muscle de goéland marin (*Larus marinus*). Les amorces consensuelles MI50 ont été utilisées pour amplifier 20 ng d'ADN extrait des tissus de chaque espèce de goéland. Les produits d'amplification PCR ont été séquencés avec les amorces consensuelles MI50 par la plateforme de génomique du Centre d'innovation Genome Québec et Université McGill. Les résultats de séquençage ont été reçus via l'application web Nanuq puis visualisés et modifiés avec le logiciel Chromas Lite. Les séquences furent alignées par l'application web Clustal W puis visualisées et modifiées avec le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.9.0 (Hall 1999). Le contig obtenu fut utilisé pour concevoir de nouvelles amorces, soit Go616G, Go616D, Go1427G et Go1427D (Tableau 2.VIII).

Tableau 2.VIII
Séquence des paires d'amorces utilisées pour le séquençage de l'ADNmt du goéland

| Nom des amorces | Séquence de référence | Position | Séquence (5' → 3') |
|-----------------|-----------------------|-------------|---------------------------|
| MI50-F | J01415 | 1069 - 1092 | ACTGGGATTAGATACCCCACTATG |
| MI50-R | J01415 | 2978 - 3000 | TGATCCAACATCGAGGTCGTA AAA |
| Go616G | AY293619 | 1117 - 1136 | TAGCCCAACCATACTGCACA |
| Go616D | AY293619 | 1117 - 1136 | TGTGCAGTATGGTTGGGCTA |
| Go1427G | AY293619 | 1946 - 1965 | GCCCGACTGTTTACCAAAAA |
| Go1427D | AY293619 | 1946 - 1965 | TTTTTGGTAAACAGTCGGGC |

Tableau 2.IX
Séquence des paires d'amorces utilisées et taille de l'amplicon généré.

| Nom et organisme | Séquence de référence et position | Séquence (5' → 3') | Taille de l'amplicon (pb) |
|---------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>Bactéries</i> | | | |
| | <i>NC_010473.1</i> | | |
| 27F-YM ¹ | 197882 - 197901 | AGAGTTTGATYMTGGCTCAG | 1534 |
| 1541R ² | 199396 - 199415 | AAGGAGGTGATCCARCCGCA | |
| <i>Vertébrés</i> | | | |
| | <i>J01415</i> | | |
| MI50-F | 1069 - 1092 | ACTGGGATTAGATACCCCACTATG | 1932 |
| MI50-R | 2978 - 3000 | TGATCCAACATCGAGGTCGTAAA | |
| <i>Humain</i> | | | |
| | <i>J01415</i> | | |
| HUmito5-G | 1515 - 1539 | GGACATTTAACTAAAACCCCTACGC | 207 |
| HUmito5-D | 1698 - 1721 | GGCTAAGGTTGTCTGGTAGTAAGG | |
| <i>Porc</i> | | | |
| | <i>AF034253</i> | | |
| POmito5-G | 2127 - 2151 | CCTATATTCAATTACACAACCATGC | 146 |
| POmito5-D | 2251 - 2272 | CAAAGTACCCATACATTGTGGG | |
| <i>Bœuf</i> | | | |
| | <i>AY526085</i> | | |
| BOmito5-G | 1290 - 1311 | GATTCAGTGCATCTAACCCCTAT | 206 |
| BOmito5-D | 1475 - 1495 | CTTGTTGTTTAGTCGAGAGG | |
| <i>Mouton</i> | | | |
| | <i>AF010406</i> | | |
| OVmito5-G | 948 - 972 | CCTATTTACATATATCAACCACACG | 189 |
| OVmito5-D | 1113 - 1136 | GTTATTTAACTGGAGAGTGGGAG | |
| <i>Chèvre</i> | | | |
| | <i>AF533441</i> | | |
| CVmito5-G | 938 - 957 | CACTCAAGCCTATTAACACG | 202 |
| CVmito5-D | 1117 - 1139 | GACTGTTTTGGTAATTTAGATGG | |
| <i>Coq</i> | | | |
| | <i>X52392</i> | | |
| CKmito5-G | 2199 - 2219 | TATACTTCCCCTCCCGGCTAA | 186 |
| CKmito5-D | 2364 - 2384 | GTAAAGGGTACGAGTTTGTCG | |
| <i>Dinde</i> | | | |
| | <i>EF153719</i> | | |
| DImito5-G | 961 - 984 | CAATAAATAATACCCAACCTAGC | 199 |
| DImito5-D | 1139 - 1159 | TTGATGGTTAATGGGGTATGG | |
| <i>Caille</i> | | | |
| | <i>AP003195</i> | | |
| CAMito5-G | 2094 - 2116 | CTCTTCAAAGCTACTAATACCG | 236 |
| CAMito5-D | 2309 - 2329 | AACTGTGTGAGGTGATTTTGG | |
| <i>Cheval</i> | | | |
| | <i>X79547</i> | | |
| CHmito5-G | 958 - 982 | CATAACATAACATAAAACCGTGACC | 201 |
| CHmito5-D | 1135 - 1158 | GTGACTAAGGGTAATGAATTAGG | |
| <i>Cerf rouge</i> | | | |
| | <i>AB245427</i> | | |
| CRmito5-G | 929 - 953 | GGCACAGTACACTCAAATTTATTTG | 191 |
| CRmito5-D | 1102 - 1120 | TGAATGGGCTTGCCGGCTA | |
| <i>Caribou</i> | | | |
| | <i>AB245426</i> | | |
| CBmito5-G | 926 - 946 | GTAAGCACAATACACTTAAAC | 198 |
| CBmito5-D | 1105 - 1123 | AGTGTGAATGGGTTTATGG | |
| <i>Autruche</i> | | | |
| | <i>AF338715</i> | | |
| AUmito5-G | 956 - 976 | CCCATACATAATAAGCTCCGC | 181 |
| AUmito5-D | 1116 - 1136 | TTGTTCAAGTGGGTGGATGAG | |
| <i>Émeu</i> | | | |
| | <i>AF338711</i> | | |
| EMmito5-G | 1120 - 1141 | GCTCAACTATAATTCTACCTCC | 169 |
| EMmito5-D | 1267 - 1288 | GTCTTTGCTATTTCTTGCTTGC | |
| <i>Goéland</i> | | | |
| | <i>AY293619</i> | | |
| GOmito6-G | 536 - 557 | AATCTCGATGCTTGCCGTACCA | 208 |
| GOmito6-D | 722 - 743 | GTGCTCACTATTGGGCTTTCAG | |

¹ (Ludwig *et al.* 1993; Frank *et al.* 2008); ² (Wang *et al.* 1996; Tandukar *et al.* 2009)

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.1 Validation des amorces consensuelles et spécifiques

3.1.1 Extraction de l'ADN matrice

L'ADN matrice utilisé pour la validation des amorces et l'optimisation des conditions d'amplification PCR provenait de tissus animaux et d'eaux usées de la station d'épuration de Rosemère-Lorraine. La concentration et la pureté de l'ADN extrait ont été évaluées par spectrophotométrie (Section 2.1.3, Tableau 3.1, Tableau C.IV et Tableau C.VI). Le spectrophotomètre NanoDrop™ ND-1000 (*NanoDrop products, Wilmington, DE, É.-U.*) mesure l'absorbance du produit d'extraction aux longueurs d'onde du spectre UV-Visible. Puisque les acides nucléiques absorbent la lumière à 260 nm (A_{260}), cette valeur a été utilisée par le logiciel NanoDrop ND-1000 version 3.1.2 pour calculer la concentration en ADN double brin selon l'équation de Beer-Lambert modifiée (Thermo Fisher Scientific 2008).

L'ADN extrait peut contenir des réactifs d'extraction résiduels ou des molécules co-extraites. La pureté a été considérée acceptable lorsque les ratios A_{260}/A_{230} et A_{260}/A_{280} avaient une valeur respective de 2,0-2,2 et d'environ 1,8. Un ratio A_{260}/A_{230} significativement inférieur indiquait la présence de contaminants absorbant à 230 nm (p. ex. la guanidine). Pareillement, un ratio A_{260}/A_{280} trop faible suggérait que le produit d'extraction était contaminé par des molécules ayant une forte absorbance à 280 nm (p. ex. des protéines) alors qu'une valeur significativement plus élevée pouvait signifier la présence d'ARN dans le produit d'extraction. L'ADN extrait présentait invariablement un ratio A_{260}/A_{230} très en deçà des valeurs acceptables, indépendamment du manipulateur. La seule exception fut le produit d'extraction ayant généré la plus forte concentration en ADN, soit celui provenant de cellules humaines. Le ratio A_{260}/A_{280} était généralement acceptable quoiqu'il ait probablement pu être amélioré par une étape supplémentaire de digestion à la RNase.

Tous les produits d'extraction d'ADN ont aussi été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 3.1) Un profil de migration correspondant majoritairement à de hauts

pois moléculaires indiquait que l'ADN n'a pas été dégradé par les multiples étapes d'extraction. La majorité des produits d'extraction ont été assez concentrés pour être visualisés et ont montré une intégrité satisfaisante.

Tableau 3.I
Spectrophotométrie de l'ADN total extrait de tissus animaux et d'eaux usées de la station de traitement de Rosemère-Lorraine.

| Échantillon | Concentration d'ADN (ng/µl) | A_{260}/A_{230} | A_{260}/A_{280} |
|-------------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| Humain | 378,79 | 2,33 | 1,90 |
| Porc | 46,49 | 1,30 | 1,87 |
| Bœuf | 38,22 | 0,91 | 1,84 |
| Mouton | 27,51 | 1,09 | 1,75 |
| Chèvre | 44,42 | 0,78 | 1,88 |
| Coq | 68,93 | 0,74 | 2,17 |
| Dinde | 62,02 | 0,45 | 1,83 |
| Caille | 82,81 | 0,68 | 2,19 |
| Cheval | 76,05 | 0,51 | 1,66 |
| Cerf rouge | 76,27 | 0,53 | 1,73 |
| Caribou | 38,43 | 0,96 | 1,57 |
| Autruche | 52,00 | 0,53 | 1,84 |
| Émeu | 43,87 | 0,61 | 1,80 |
| Goéland à bec cerclé | 111,67 | 0,68 | 1,74 |
| Goéland argenté | 151,05 | 0,82 | 1,78 |
| Goéland marin | 69,76 | 0,42 | 1,76 |
| Eau usée de Rosemère-Lorraine | 114,25 | 0,24 | 1,89 |

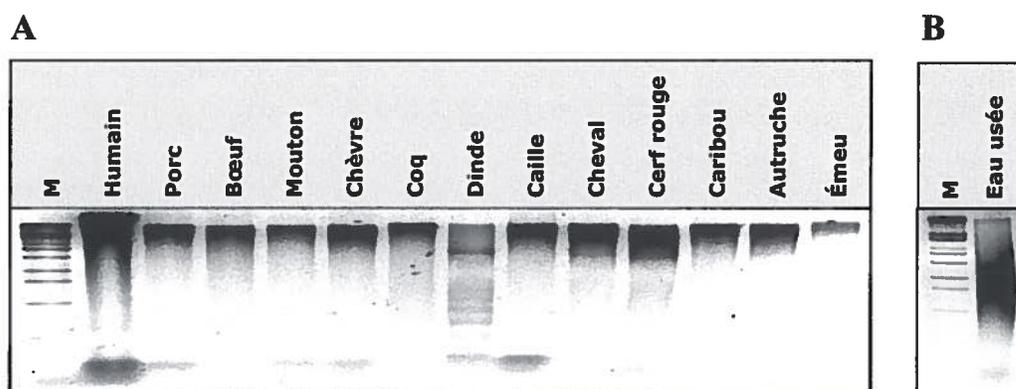


Figure 3.1
Produits d'extraction de l'ADN.
Électrophorèse sur gel d'agarose 1 % de 5 µl d'ADN purifié à partir de tissus animaux (A) ou d'eau usée de la station de traitement de Rosemère-Lorraine (B).
M : Marqueur de poids moléculaire ADN du phage Lambda digéré par l'enzyme *StyI*

3.1.2 Validation des amorces consensuelles et spécifiques

Dès le commencement du projet, la paire d'amorces consensuelles MI50 avait déjà été conçue par la collaboratrice Minh Vuong à partir de séquences hautement conservées au sein de l'alignement des génomes mitochondriaux de plus d'une cinquantaine d'espèces animales (Tableau 2.II). Par la suite, notre analyse *in silico* de la spécificité des amorces consensuelles a indiqué que les séquences de MI50-F et MI50-R étaient respectivement complémentaires à l'ADN d'au moins 173 et 120 espèces de vertébrés (Section 2.3.1, Tableau 2.III). Cette conservation a aussi été vérifiée expérimentalement en effectuant des amplifications PCR à partir d'environ 1 ng d'ADN total de chaque espèce animale étudiée (Figure 3.3). Dans tous les cas, la paire d'amorces consensuelles MI50 a généré des amplicons de la taille attendue, soit environ 1900 à 2000 pb.

Pour concevoir les amorces spécifiques, un alignement a été préparé à partir des séquences des amplicons générés par les amorces consensuelles chez une cinquantaine d'espèces animales incluant les quatorze espèces ciblées par le projet (Tableau 2.IV). Chaque paire d'amorces spécifiques a ainsi été conçue à partir de séquences qui étaient conservées au sein d'une même espèce mais qui présentaient plusieurs polymorphismes nucléotidiques par rapport aux autres espèces animales.

Comme pour les amorces consensuelles, une analyse *in silico* a permis de confirmer que chaque paire d'amorces spécifiques étaient théoriquement en mesure de s'hybrider à l'ADNmt des espèces animales qu'elles ciblaient (Tableau 2.V). La spécificité des amorces conçues a été vérifiée expérimentalement en utilisant comme ADN matrice 1 µl du produit d'amplification PCR consensuelle généré pour chaque espèce à partir de son ADN total (Figure 3.4 et Figure 3.5). Dans tous les cas, les amorces spécifiques ont généré des amplicons de la taille attendue (de 146 pb à 236 pb) et aucune amplification croisée ou non-spécifique n'a été observée.

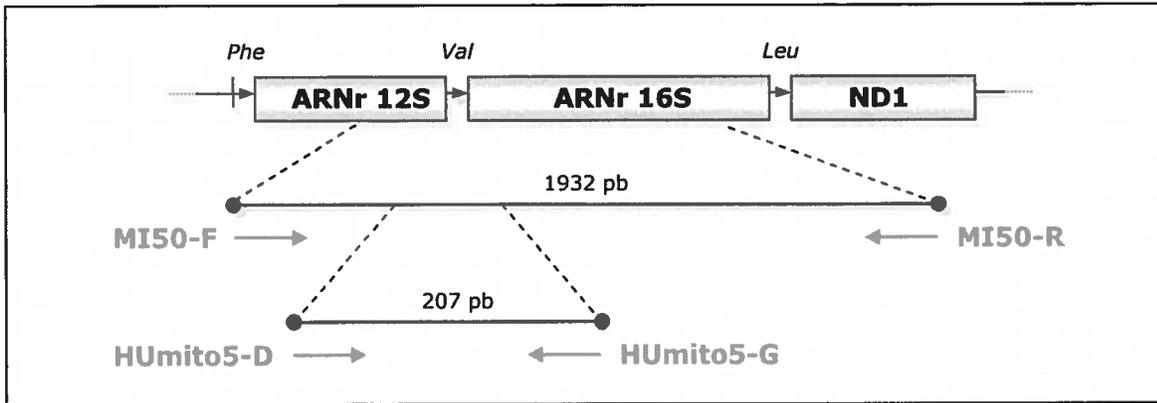


Figure 3.2
Stratégie de détection et d'identification de l'ADNmt humain par amplification PCR consensuelle et amplification nPCR spécifique.

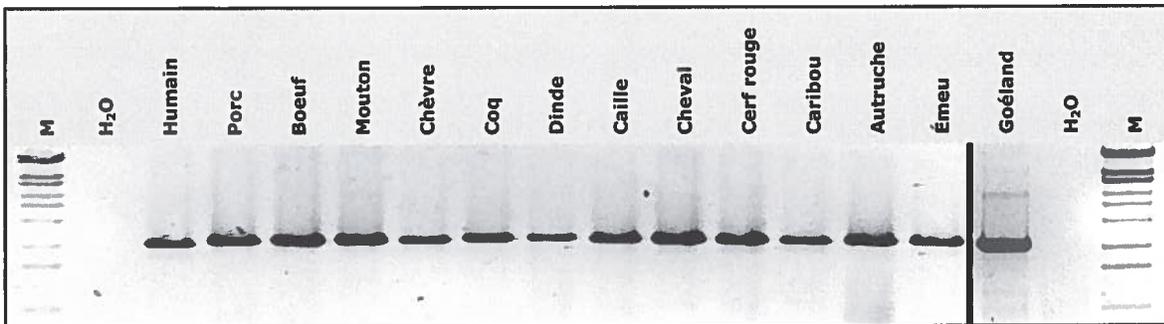


Figure 3.3
Amplification PCR consensuelle générée à partir d'ADN purifié de tissus animaux. Électrophorèse sur gel d'agarose 1 % de 5 µl des produits d'amplification PCR. M : Marqueur de poids moléculaire ADN du phage Lambda digéré par l'enzyme *StyI*

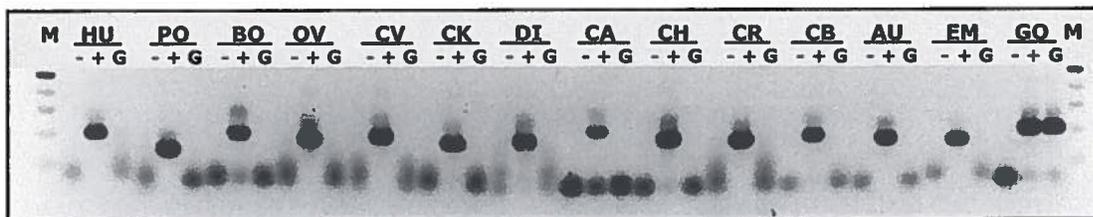


Figure 3.4
Spécificité de l'amplification nPCR par les amorces G0mito6
Électrophorèse sur gel d'agarose 2 % de 5 µl des produits d'amplification nPCR générés par chaque paire d'amorces à partir d'un contrôle d'eau (-), d'un contrôle positif d'amplicons correspondant l'espèce ciblée (+) et d'amplicons consensuels de goéland à bec cerclé (G). La zone de migration illustrée correspond aux bandes inférieures ou égales à 500 pb du marqueur de poids moléculaire exACTGene™ Mid Range Plus DNA (M).

| Paire d'amorces | Amplicons consensus utilisés comme ADN matrice | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--|--------|------|------|--------|--------|-----|-------|--------|--------|------------|---------|----------|------|---------|
| | H ₂ O | Humain | Porc | Bœuf | Mouton | Chèvre | Coq | Dinde | Caille | Cheval | Cerf rouge | Caribou | Autruche | Émeu | Goéland |
| HUmito5 | | ■ | | | | | | | | | | | | | ND |
| POmito5 | | | ■ | | | | | | | | | | | | ND |
| BOmito5 | | | | ■ | | | | | | | | | | | ND |
| OVmito5 | | | | | ■ | | | | | | | | | | ND |
| CVmito5 | | | | | | ■ | | | | | | | | | ND |
| CKmito5 | | | | | | | ■ | | | | | | | | ND |
| DImito5 | | | | | | | | ■ | | | | | | | ND |
| CAmito5 | | | | | | | | | ■ | | | | | | ND |
| CHmito5 | | | | | | | | | | ■ | | | | | ND |
| CRmito5 | | | | | | | | | | | ■ | | | | ND |
| CBmito5 | | | | | | | | | | | | ■ | | | ND |
| AUmito5 | | | | | | | | | | | | | ■ | | ND |
| EMmito5 | | | | | | | | | | | | | | ■ | ND |
| GOmito6 | | | | | | | | | | | | | | | ■ |

Figure 3.5

Spécificité des amplifications nPCR par les amorces spécifiques

Électrophorèse sur gel d'agarose 2 % de 5 µl des produits d'amplification nPCR générés par chaque paire d'amorces à partir d'amplicons consensus de différentes espèces animales. La zone de migration illustrée se situe entre les bandes 100 pb et 300 pb du marqueur de poids moléculaire exACTGene™ Mid Range Plus DNA. ND : La possibilité d'amplification non spécifique de l'ADN de goéland par les autres paires d'amorces spécifiques a été vérifiée tel que présenté dans la Figure 3.4.

3.1.3 Analyse des eaux usées de la station de traitement de Rosemère-Lorraine

Les différentes paires d'amorces spécifiques conçues ont été utilisées pour détecter spécifiquement l'ADNmt présent dans les eaux usées de la station de traitement de Rosemère-Lorraine par amplification nPCR en temps réel. Cette méthode avait pour avantage de ne pas nécessiter la visualisation des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose. En effet, le SYBR Green contenu dans le mélange réactionnel se liait spécifiquement à l'ADN double brin, ce qui augmentait simultanément l'intensité de sa fluorescence. À chaque cycle, l'accroissement de l'intensité de la fluorescence émise en fin de phase d'élongation confirmait que des produits d'amplification avaient été formés. Toutefois, cette évaluation incluait toutes les formes d'ADN double brin et ne permettait pas de les discriminer. Les produits spécifiques ont donc été distingués des produits non spécifiques et des dimères d'amorces en les soumettant à une rampe de température ascendante et en analysant la dénaturation. La température de dénaturation d'un ADN double brin dépend de la taille et de la composition de sa séquence et c'est à cette température que la libération des molécules de SYBR Green entraîne une importante diminution de la fluorescence mesurée. En représentant graphiquement la dérivée négative de la variation de fluorescence en fonction de la température, il a été possible d'identifier les pics correspondant aux températures de dénaturation des différents amplicons présents dans le produit réactionnel (Tableau 3.11, Figure 3.6 et Figure 3.7). Le seuil de détection a été fixé arbitrairement à 1.

Les essais effectués pour chaque espèce comprenaient un contrôle négatif (sans ADN matrice), un contrôle positif (mélange équimolaire d'amplicons consensuels de toutes les espèces étudiées²) et l'échantillon d'eaux usées (produit d'amplification PCR consensuelle générée à partir d'ADN extrait des eaux usées). Pour toutes les paires d'amorces spécifiques, la courbe de dénaturation du contrôle positif n'a présenté qu'un seul pic correspondant à l'amplicon spécifique (Figure 3.6 et Figure 3.7). Ce pic était aussi

² Comme contrôle positif de chaque essai, il aurait aussi été possible d'utiliser seulement les amplicons consensuels correspondant aux amorces spécifiques. Toutefois, l'utilisation d'un mélange a été privilégiée pour simplifier les manipulations et pour éviter qu'une erreur d'association entre les amplicons consensuels et les amorces spécifiques ne génère un résultat négatif du contrôle positif, ce qui rendrait l'essai non significatif.

précédé d'un épaulement suggérant la présence d'une multitude d'amplicons plus courts et générés par une élongation incomplète. En général, la courbe de dénaturation du contrôle négatif (mélange réactionnel sans ajout d'ADN) était nulle tel qu'attendu (Figure 3.6). Toutefois, un petit pic a été observé avec les paires d'amorces spécifiques CKmito5, CAmito5 et GOMito6 à respectivement 77,2 °C, 73,2 °C, et 75 °C. Cela est attribuable à l'ADN double brin généré par la formation de dimères ou de structures secondaires stables au sein de ces amorces. Les analyses des eaux usées ont indiqué la présence des marqueurs mitochondriaux de l'humain, du porc, du bœuf, du coq et du cheval (Figure 3.7).

Tableau 3.II
Température de dénaturation des amplicons générés par les amorces spécifiques.

| Couleur | Paire d'amorces | Spécificité de la détection | Température de dénaturation (°C) | | |
|---------|-----------------|-----------------------------|----------------------------------|------------------|--------------|
| | | | Contrôle positif | Contrôle négatif | Eaux usées |
| | HUmito5 | Humain | 81,0 | ND | 73,2 et 81,2 |
| | POmito5 | Porc | 78,2 | ND | 78,3 |
| | BOmito5 | Bœuf | 78,7 | ND | 78,7 |
| | OVimto5 | Mouton | 78,2 | ND | |
| | CVmito5 | Chèvre | 78,0 | ND | |
| | CKmito5 | Coq | 82,3 | 77,2 | 82,5 |
| | DImito5 | Dinde | 81,2 | ND | |
| | CAmito5 | Caille | 81,8 | 73,2 | 73,8 |
| | CHmito5 | Cheval | 78,5 | ND | 79,0 |
| | CRmito5 | Cerf rouge | 77,3 | ND | |
| | CBmito5 | Caribou | 76,7 | ND | |
| | AUmito5 | Autruche | 73,3 et 81,3 | ND | |
| | EMmito5 | Émeu | 76,7 | ND | |
| | GOMito6 | Goéland | 73,5 et 84,2 | 75 | 75 et 81,8 |

ND : Aucune variation de la fluorescence supérieure au seuil n'a été mesurée.

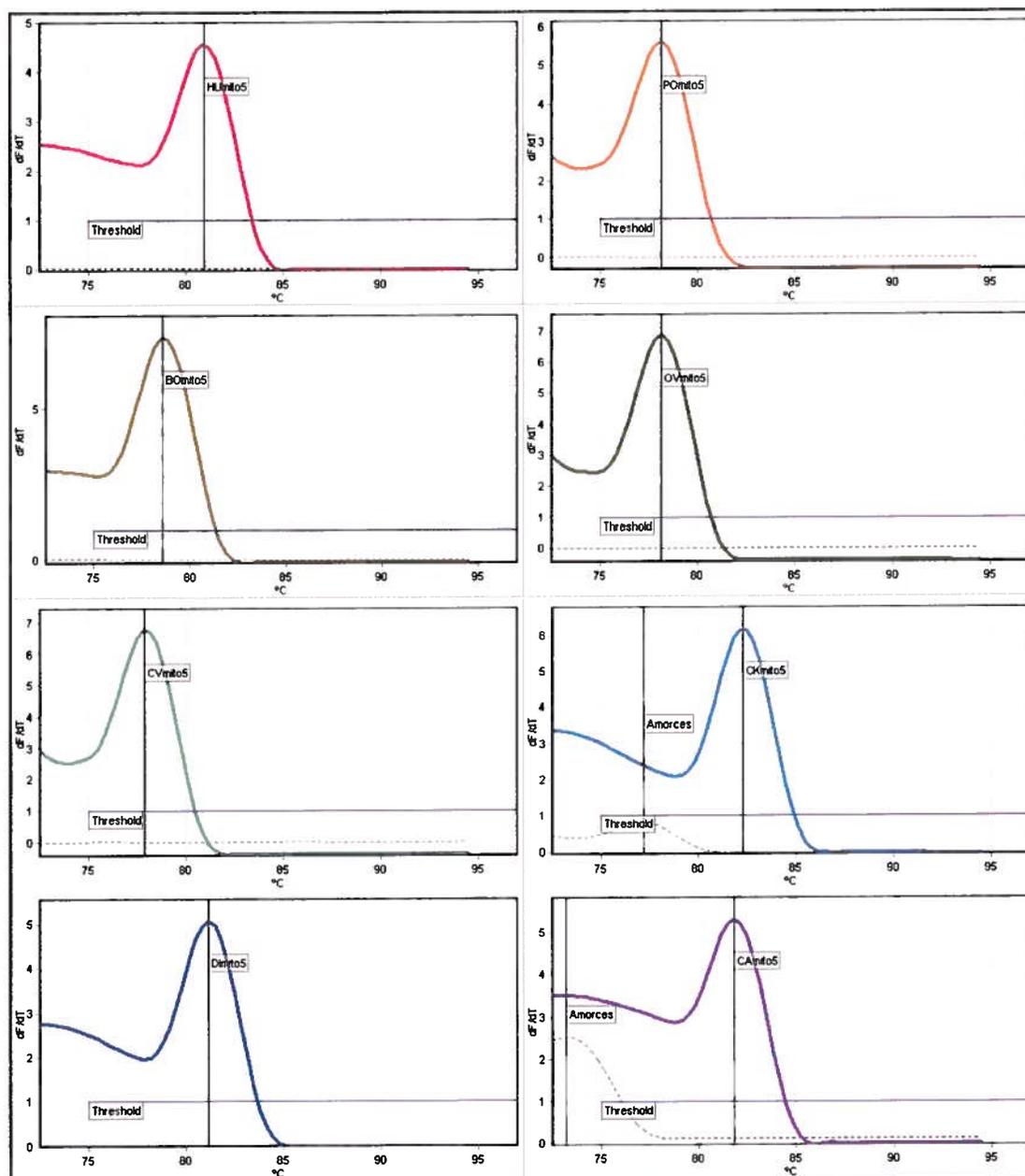


Figure 3.6
Courbe de dénaturation caractéristique des produits d'amplification nPCR générés par chaque
paire d'amorces spécifiques.
Threshold signifie seuil. La spécificité des paires d'amorces est précisée dans le Tableau 3.II.

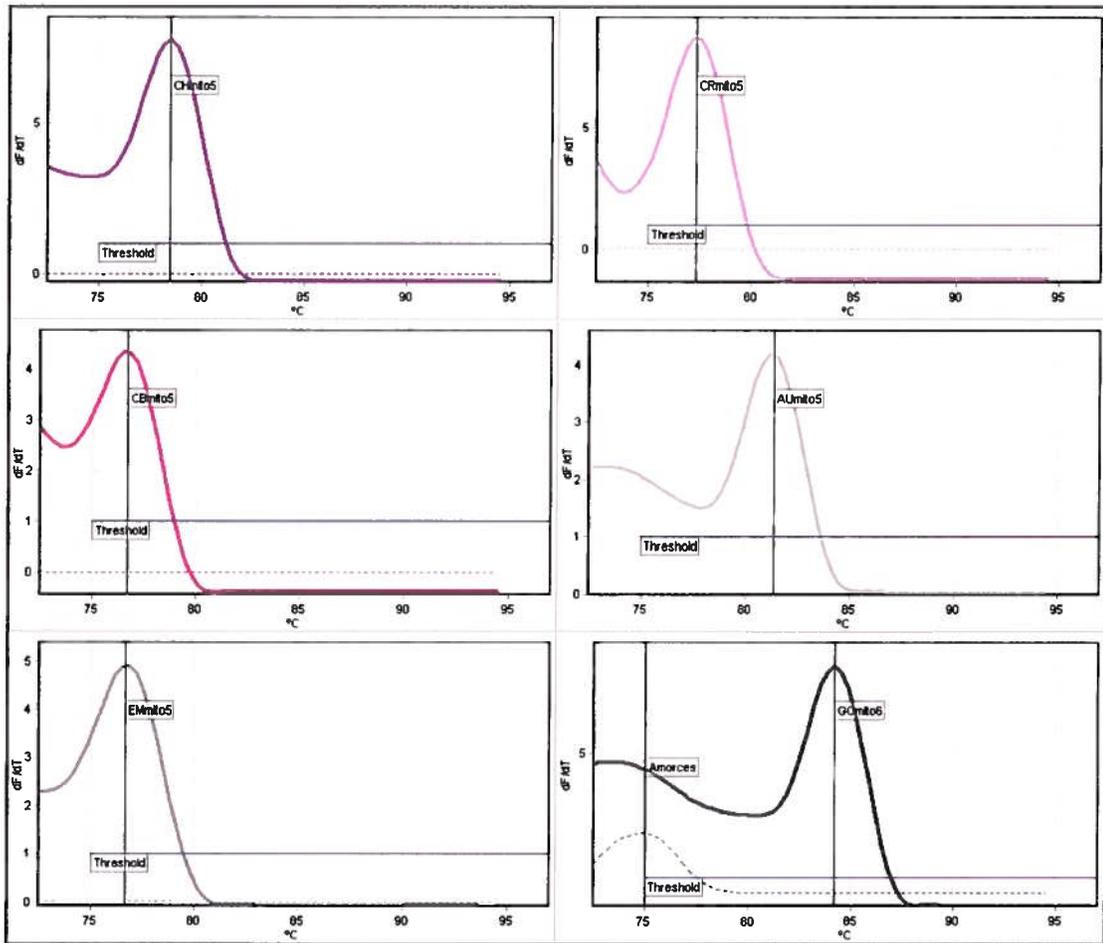


Figure 3.6 (suite)

Courbe de dénaturation caractéristique des produits d'amplification nPCR générés par chaque paire d'amorces spécifiques.

Threshold signifie seuil. La spécificité des paires d'amorces est précisée dans le Tableau 3.II.

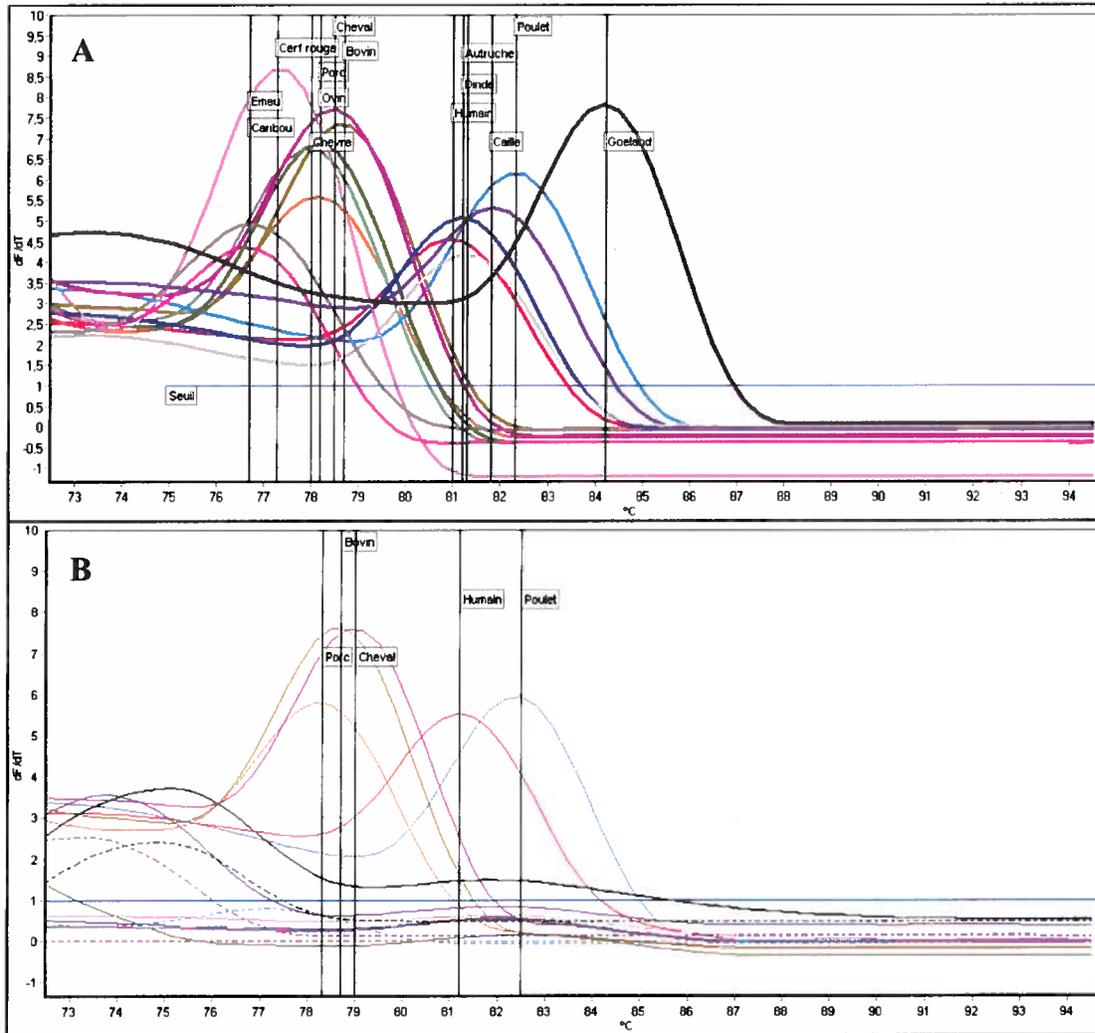


Figure 3.7

Courbe de dénaturation des produits d'amplification nPCR en temps réel générés lors de la détection des marqueurs mitochondriaux dans les eaux usées de la station de traitement de Rosemère-Lorraine.

Les différentes courbes colorées correspondent aux différentes analyses nPCR spécifiques effectuées individuellement mais représentés ici dans un même graphique de synthèse regroupant les contrôles positifs (A) ou les contrôles négatifs et les eaux usées (B). Les courbes épaisses correspondent aux contrôles positifs, les courbes hachurées correspondent aux contrôles négatifs et les courbes fines correspondent aux eaux usées. Les termes « bovin », « ovin » et « poulet » correspondent respectivement au bœuf, au mouton et au coq.

3.2 Optimisation des conditions d'amplification PCR

3.2.1 Température d'appariement

Au cours d'un cycle d'amplification PCR, l'une des incubations doit être effectuée à une température permettant aux amorces de s'apparier aux brins d'ADN matrice et d'amplicons dénaturés. Pour déterminer quelle température d'appariement (T_a) génère le meilleur rendement, des amplifications PCR ont été effectuées à des T_a variant de 55 °C à 68 °C avec un incrément de 1°C entre chaque réaction et en incluant des duplicatas à 60 °C, 61 °C et 62 °C. Les amplifications PCR de 20 µl ont été préparées à partir d'une dilution 1 :10 de l'ADN extrait des eaux usées de la station d'épuration de Rosemère-Lorraine et avec les amorces MI50-F et MI50-R à une concentration finale de 0,2 µM. Ces faibles quantités d'amorces et d'ADN matrice avaient pour but de générer des conditions suboptimales afin de bien distinguer la variation du rendement d'amplification en fonction de la température (Figure 3.8). La T_a sélectionnée a été celle qui semblait, en apparence, présenter le meilleur rendement d'amplification, soit 60 °C.



Figure 3.8

Optimisation de la température d'appariement de la paire d'amorces consensuelles MI50.

Électrophorèse sur gel d'agarose 1 % de 5 µl des produits d'amplification PCR générés à différentes températures d'appariement à partir de l'ADN extrait des eaux usées de la station d'épuration de Rosemère-Lorraine.

M : Marqueur de poids moléculaire exACTGene™ Mid Range Plus DNA

Souligné bleu : Température d'appariement sélectionnée

L'optimisation a été répétée pour les amorces spécifiques en utilisant comme ADN matrice des amplicons consensuels de l'espèce ciblée. Selon le fabricant de l'ADN polymérase DyNAzyme Hot Start II, il est préférable de favoriser la plus haute température permettant l'appariement des amorces à l'ADN matrice (New England Biolabs 2007).

La T_a sélectionnée a donc été la plus élevée à laquelle le rendement d'amplification était satisfaisant pour toutes les paires d'amorces spécifiques, soit 55 °C (Figure 3.9).

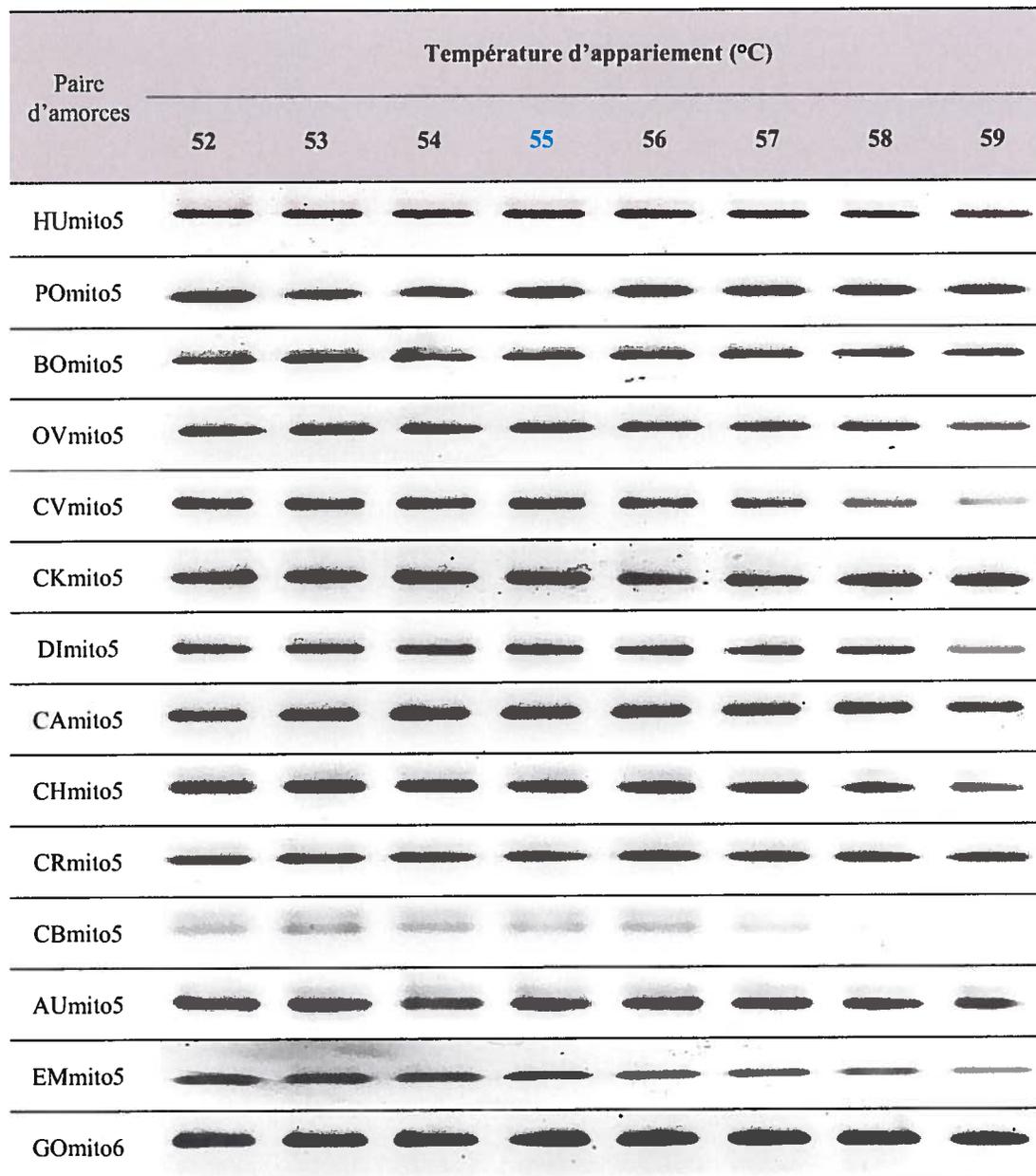


Figure 3.9

Optimisation de la température d'appariement des amorces spécifiques.

Électrophorèse sur gel d'agarose 1 % de 5 µl des produits d'amplification nPCR générés à différentes températures d'appariement. La zone de migration illustrée est située sous la bande 500 pb du marqueur de poids moléculaire exACTGene™ Mid Range Plus DNA.

3.2.2 Concentration des amorces spécifiques

La concentration des amorces ajoutées au mélange réactionnel a été optimisée en tenant compte des recommandations des fabricants de polymérase ADN et des particularités des amplifications PCR consensuelles et spécifiques. Dans le cas des amorces spécifiques, une attention particulière a été apportée à la possibilité qu'une concentration trop faible puisse diminuer la sensibilité de détection alors qu'une concentration trop élevée puisse augmenter la probabilité de formation de dimères et de fluorescence non-spécifique. Il aurait été laborieux de déterminer pour chaque paire d'amorces quelle concentration permet d'optimiser la sensibilité et la spécificité du signal. Alternativement, l'optimisation a consisté à étudier l'efficacité et la spécificité de conditions réactionnelles extrêmes. Ainsi, des dilutions décimales d'amplicons consensuels ont été utilisées pour effectuer des amplifications nPCR par des amorces formant des dimères (GOmito6) ou non (HUmito5) et à des concentrations faibles (0,2 μM) ou élevées (0,5 μM).

Le coefficient de linéarité de la courbe standard (R^2) et l'efficacité d'amplification ont été calculés à partir des valeurs de fluorescence mesurées à chaque cycle d'amplification (Figure 3.10). Pour considérer qu'une amplification était performante, le R^2 et l'efficacité devaient être respectivement de plus de 0,980 et de 90-105 %. Le R^2 de la courbe standard des différents essais a toujours été acceptable avec des valeurs supérieures à 0,997. En ce qui concerne l'efficacité, elle s'est avérée meilleure à haute concentration. Plus précisément, les amorces HUmito5, ont été efficaces à 76,0 % pour les réactions de 0,2 μM et à 86,5 % pour les réactions de 0,5 μM alors que l'efficacité des amorces GOmito6 a été évaluée à 95,7 % pour les réactions de 0,2 μM et à 97,1 % pour les réactions de 0,5 μM .

La fluorescence non spécifique générée par les structures secondaires des amorces a été évaluée en observant la courbe de dénaturation adoptée par les produits réactionnels des contrôles négatifs (Figure 3.11). Avec les amorces HUmito5, aucune variation de fluorescence significative n'a été observée, quelle que soit la concentration d'amorces. Toutefois, avec les amorces GOmito6, les contrôles négatifs présentaient un pic de dénaturation non spécifique à environ 75,2 °C et dont l'intensité était supérieure dans les

réactions contenant 0,5 μM d'amorces. En dépit des meilleures efficacités obtenues à 0,5 μM , une concentration de 0,2 μM a été sélectionnée pour minimiser les biais entraînés par la fluorescence non spécifique des dimères de certaines paires d'amorces.

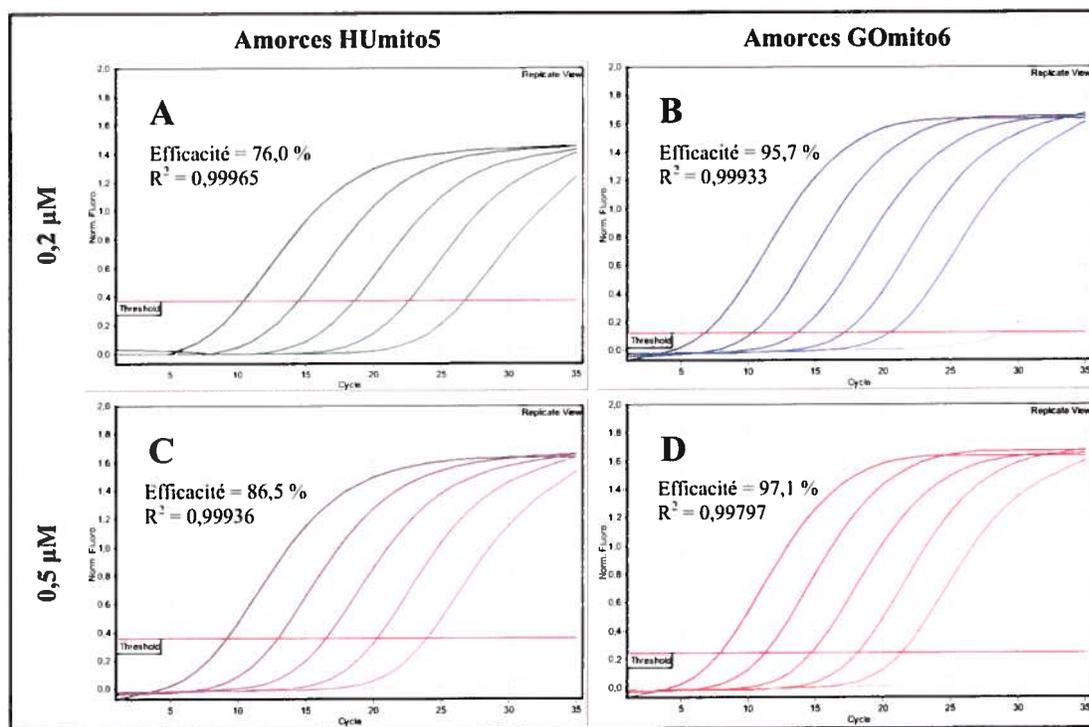


Figure 3.10

Efficacité et spécificité de l'amplification générée par différentes concentrations d'amorces spécifiques.

Graphiques représentant la fluorescence normalisée du SYBR Green en fonction du cycle d'amplification PCR. Des courbes standard ont été préparées avec les paires d'amorces HUmito5 (A et C) ou GOMito6 (B et D) à des concentrations de 0,2 μM (A et B) ou 0,5 μM (C et D). Chaque courbe représente la moyenne géométrique calculée à partir de triplicatas. Les courbes hachurées représentent les contrôles négatifs.

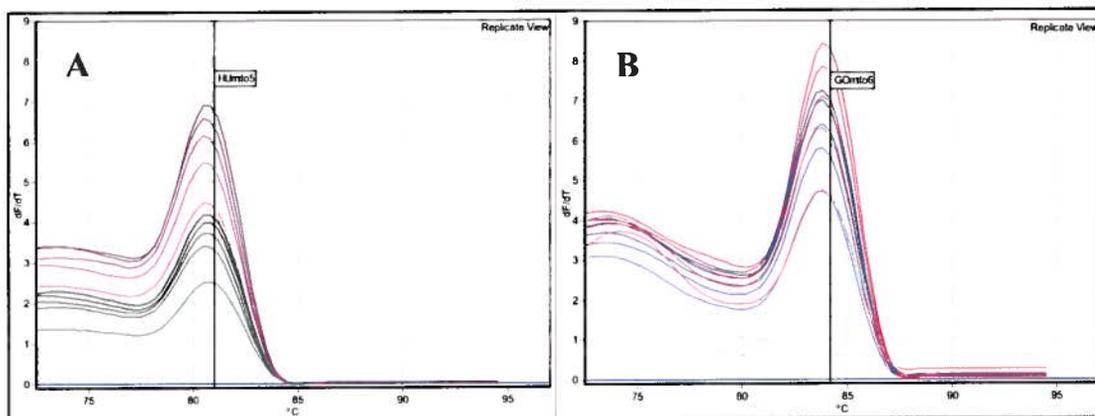


Figure 3.11

Courbe de dénaturation des produits d'amplification générés par différentes concentrations d'amorces.

Graphiques représentant la dérivée négative de la fluorescence en fonction de la température. Chaque courbe représente la moyenne géométrique calculée à partir de triplicatas. A : Utilisation des amorces HUmito5 à des concentrations de 0,2 μM (vert) ou 0,5 μM (violet). B : Utilisation des amorces GOMito6 à des concentrations de 0,2 μM (bleu) ou 0,5 μM (rouge). Les courbes hachurées représentent les contrôles négatifs.

3.2.3 Purification des produits de l'amplification PCR consensuelle

La stratégie d'amplification adoptée dans le cadre de ce projet consistait à utiliser un volume du produit d'amplification PCR consensuelle pour effectuer des amplifications nPCR spécifiques (Figure 3.2). Cela était problématique dans la mesure où une portion des amorces consensuelles contenues dans le premier produit d'amplification se retrouvaient dans le mélange réactionnel de l'amplification nPCR spécifique et interagissaient avec les amorces spécifiques. Le produit réactionnel de cette deuxième amplification était alors susceptible de contenir des dimères d'amorces ou encore des produits non-spécifiques qui biaisaient le signal de fluorescence lors de l'analyse en temps réel ou qui formaient une trainée lors de l'électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 3.12 A et B, réactions « (-) » et « (+) »). Pour atténuer ce phénomène et éviter l'obtention de faux résultats positifs, les produits de la première amplification ont été purifiés de leurs amorces consensuelles par dilution ou par ultrafiltration.

3.2.3.1 Dilution

Dans un premier temps, il fallut vérifier l'hypothèse suggérant que les produits d'amplification non spécifiques aient bel et bien été générés par un réactif résiduel de la première amplification et non par une trop importante concentration d'ADN matrice. Pour ce faire, des réactions d'amplification consensuelle ont été effectuées à partir d'ADN humain non dilué « (+) », de « dilutions d'ADN » humain en série ou encore d'aucun ADN matrice (contrôle négatif nommé « (-) »). Ensuite, des « dilutions d'amplicons consensuels » ont été préparées en diluant en série le produit d'amplification consensuelle effectué à partir d'ADN humain non dilué. Tous les produits d'amplification consensuels, dilués ou non, ont finalement été utilisés pour l'amplification nPCR par les amorces spécifiques HUmito5 puis analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 3.12 A) ou en temps réel (Figure 3.12 B et C). Les réactions effectuées à partir de produits d'amplification consensuels n'ayant pas été dilués ont généré beaucoup de produits non spécifique, ce qui est reconnaissables par la formation d'une trainée sur gel (Figure 3.12 A « dilutions d'ADN ») et une modification de la courbe de profil de dénaturation (Figure 3.12 B). La dilution des amplicons consensuels a toutefois permis de n'obtenir que des amplicons spécifiques HUmito5 reconnaissables par leur taille de 207 pb (Figure 3.12 A « dilutions d'amplicons consensuels ») et leur température de dénaturation de 81,0 °C (Figure 3.12 C, Tableau 3.11).

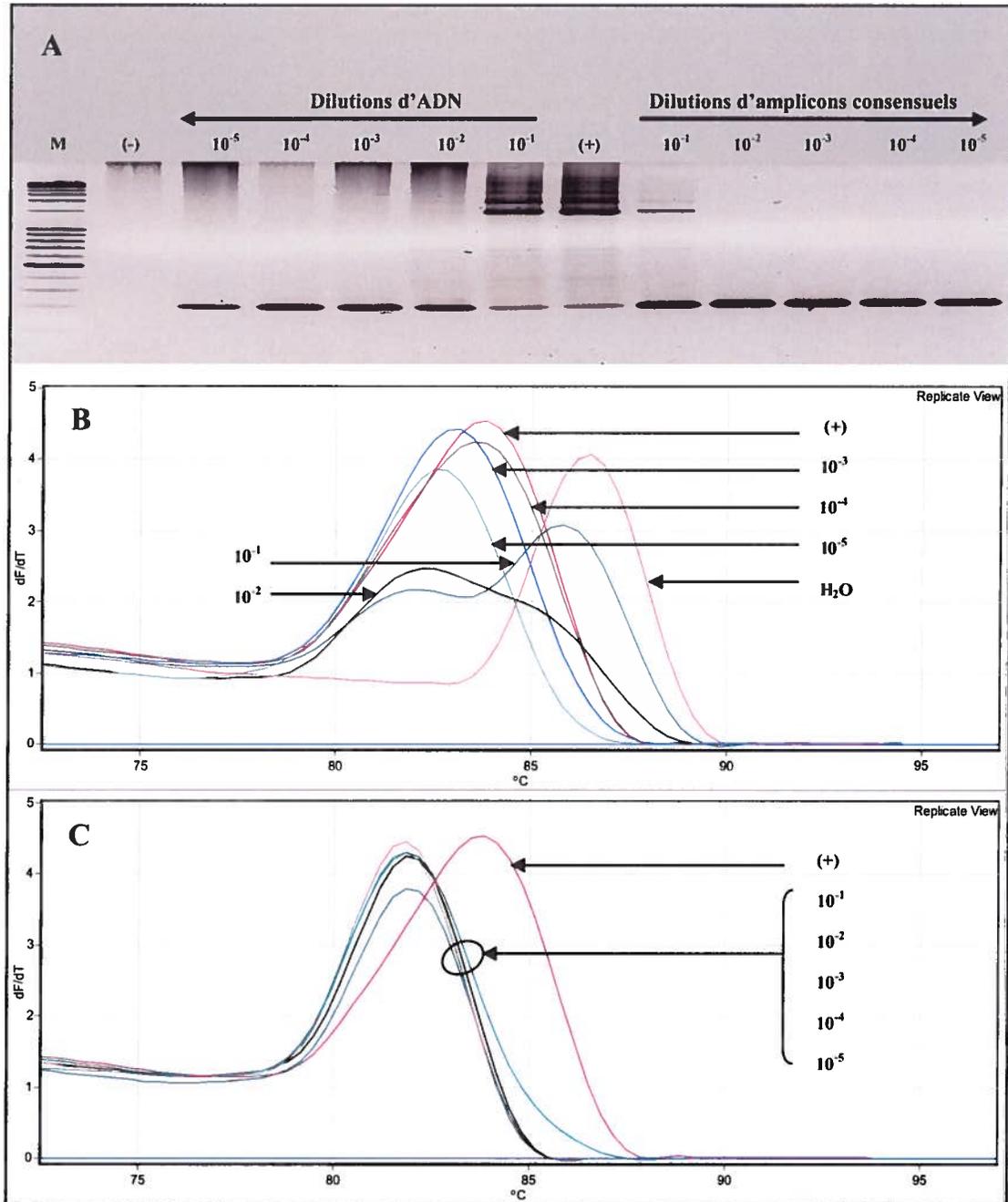


Figure 3.12

Influence de la dilution de l'ADN matrice ou des amplicons consensus sur la spécificité de l'amplification nPCR spécifique.

Électrophorèse de 5 μ l des produits d'amplification nPCR HUmito5 sur gel d'agarose 2 % (A); Courbe de dénaturation des produits de l'amplification nPCR spécifique HUmito5 générés à partir des produits d'amplification PCR consensuelle MI50 d'ADN dilué (B) ou à partir d'amplicons consensus dilués (C).

M : Marqueur de poids moléculaire exACTGene™ Mid Range Plus DNA

3.2.3.2 Ultrafiltration

Dans les produits d'amplification consensuelle, les amplicons avaient une taille moléculaire significativement plus grande que les amorces et les sels résiduels, ce qui permettait de les séparer par passage sur une membrane d'ultrafiltration. L'optimisation de cette étape était très importante puisqu'une purification incomplète ou une perte d'amplicons étaient susceptibles d'affecter négativement la spécificité ou la sensibilité des amplifications nPCR subséquentes. Ainsi, les pores de la membrane devaient être assez larges pour permettre le passage des amorces et des sels dans le filtrat mais aussi assez étroits pour retenir les amplicons dans le rétentat.

Pour déterminer la porosité la plus appropriée, des essais d'amplification et de purification ont été effectués en utilisant comme ADN matrice le produit d'extraction des eaux usées de la station de traitement de Rosemère-Lorraine. D'abord, plusieurs amplifications PCR consensuelles ont été générées puis combinées en un seul grand volume d'amplicons qui a finalement été divisé en aliquots similaires de 50 µl. Ensuite, deux aliquots ont été purifiés sur membrane de 30 kDa et deux autres aliquots ont été purifiés sur membrane de 100 kDa et un aliquot a été conservé intact (Figure 3.13 B). L'analyse des aliquots par électrophorèse sur gel d'agarose avait pour but de comparer les amplicons non purifiés avec les filtrats et rétentats pour évaluer la perte d'amplicons due à la purification. La membrane de 30 kDa n'a pas entraîné de perte significative d'amplicons consensuels (environ 2000 pb) mais n'a pas non plus permis le passage des dimères d'amorces (48 pb) vers le filtrat. La membrane de 100 kDa a entraîné un passage complet des dimères d'amorces mais a aussi généré la perte d'une partie des amplicons qui se sont aussi retrouvés dans le filtrat.

Les filtrats, les rétentats ainsi que les amplicons non purifiés ont ensuite été utilisés pour effectuer des amplifications nPCR avec les amorces HUmito5 spécifiques à l'humain (Figure 3.13 C). Dans tous les cas, l'électrophorèse sur gel d'agarose a présenté une bande spécifique de 207 pb tel qu'attendu. Toutefois, une trainée correspondant à de l'amplification non spécifique a été observée dans les réactions générées avec les amplicons non purifiés, le rétentat de plus de 30 kDa et le filtrat de moins de 100 kDa. Cela signifiait que le réactif résiduel responsable de la non-spécificité avait une taille

équivalente à 30-100 kDa et que la purification n'était optimale qu'avec la membrane de 100 kDa. Pour cette raison, cette dernière fut sélectionnée malgré le fait qu'elle ait généré des pertes d'amplicons. À propos de la trainée d'ADN de taille supérieure à 2 kb, il s'agissait d'un résultat reproductible et également observé dans les amplifications nPCR générées à partir du contrôle négatif d'une amplification consensuelle. La principale hypothèse proposée pour l'expliquer est qu'elle puisse résulter d'une succession d'appariements non-spécifiques et d'élongations situées à l'extrémité 3' d'amorces et/ou d'amplicons consensuels. Au fil des cycles d'amplification, il est possible que ce phénomène ait généré des ADN bicaténaires de haut poids moléculaire.

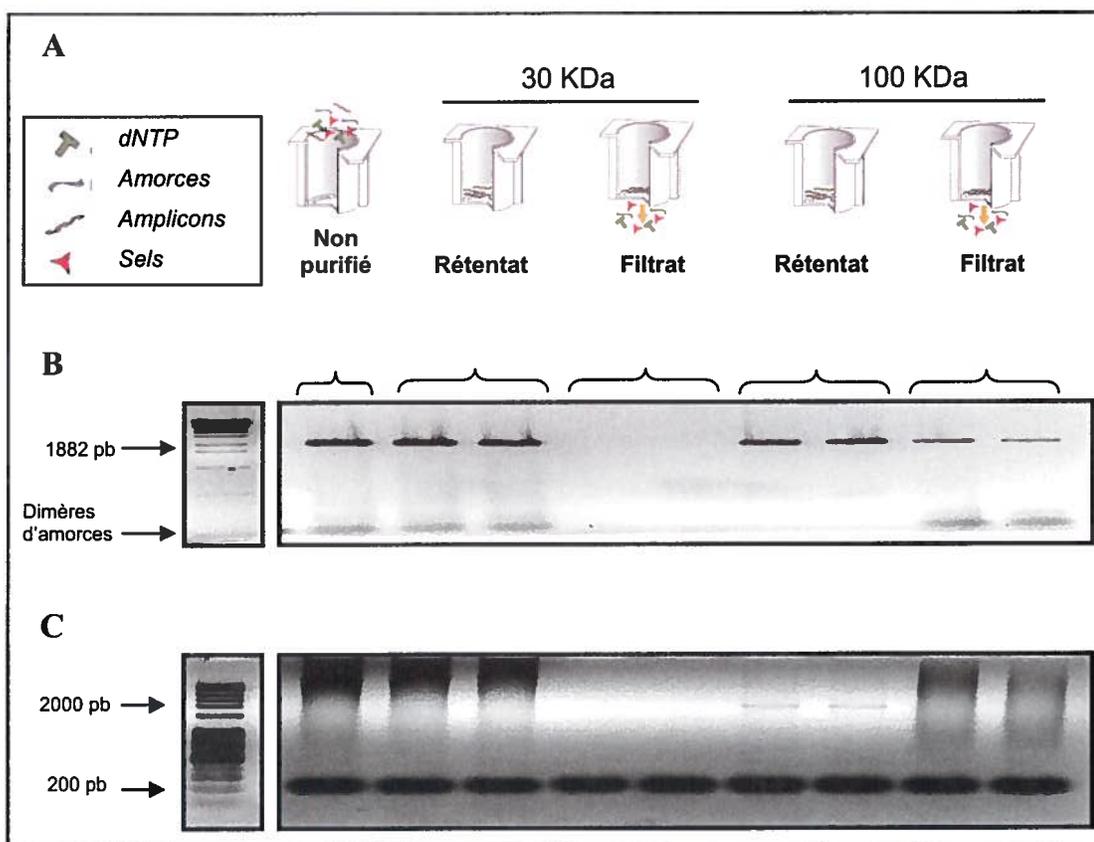


Figure 3.13

Amplification nPCR spécifique des rétentats et filtrats de purification des produits d'amplification PCR consensuelle.

Schématisme de la purification (A); électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % à 2 % de 5 µl des rétentats et filtrats de purification des produits d'amplification PCR consensuelle obtenus à partir de l'ADN des eaux usées de la station de traitement de Rosemère-Lorraine (B) et produits d'amplification PCR HUmito5 générés à partir de ceux-ci (C).

3.3 Inhibition par l'ADN matrice non-spécifique

Lors de la première amplification, est-ce que la monopolisation des amorces consensuelles par de l'ADNmt non ciblé aurait pu diminuer la sensibilité de la détection spécifique? Pour vérifier cette hypothèse, une amplification PCR consensuelle a été effectuée en utilisant comme ADN matrice les produits d'extraction d'ADN des tissus de cerf rouge et de coq dilués en série puis mélangés dans différentes proportions (section 2.3.2). Les produits d'amplification consensuelle ont ensuite été soumis à une seconde amplification par les amorces spécifiques CRmito5 (section 2.4.3). Les résultats de ces amplifications ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 3.14). D'abord, pour confirmer que les amorces consensuelles s'hybrident au génome mitochondrial du coq, des amplicons consensuels ont été obtenus en présence d'ADN de coq seulement (0 : 10 000). Ensuite, en conservant toujours la même quantité d'ADN de cerf (équivalent de 1), des quantités croissantes d'ADN de coq y ont été ajoutées (équivalent de 10 à 100 000). Tel qu'attendu, plus l'amplification consensuelle comportait d'ADN matrice de cerf et coq combinés, plus la quantité d'amplicons consensus générés a été importante. Toutefois, la quantité croissante d'ADN de coq s'est reflétée par une décroissance du rendement de l'amplification spécifique au cerf. Ainsi, il semble qu'en présence d'ADN non ciblé 100 000 fois plus concentré que l'ADN de l'espèce ciblée par l'essai, le signal de détection spécifique est diminué sans toutefois être totalement inhibé.

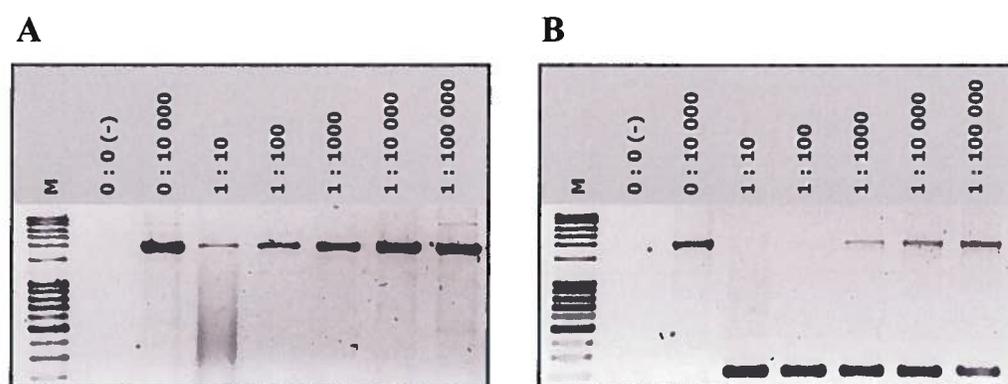


Figure 3.14

Sensibilité relative des amorces spécifiques.

Électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % des produits d'amplification PCR consensuelle MI50 (A) et d'amplification nPCR spécifique CRmito5 (B) générés à partir de différentes proportions d'ADN de cerf rouge et de coq (cerf rouge : coq).

M : Marqueur de poids moléculaire exACTGene™ Mid Range Plus DNA

3.4 Détection du produit d'amplification final par lecture de fluorescence

Dans le cadre de ce projet, la spécificité et le rendement des nombreuses amplifications nPCR spécifiques effectuées ont généralement été évalués par amplification en temps réel et par électrophorèse sur gel d'agarose. Néanmoins, il a été constaté que l'électrophorèse était laborieuse et que l'amplification en temps réel nécessitait des réactifs coûteux. Pour éviter ces désagréments, une méthodologie alternative a été proposée en combinant les réactifs abordables de l'amplification nPCR conventionnelle, la commodité de détection de la fluorescence du SYBR Green et la rapidité d'exécution offerte par le format des plaques 96 puits. En théorie, après avoir effectué l'amplification nPCR conventionnelle en plaque multi-puits, les produits réactionnels pourraient être combinés à une préparation maison de SYBR Green dont la liaison avec les amplicons générerait une fluorescence quantifiable par un simple lecteur de fluorescence en plaques (Section 2.4.4).

Des essais préliminaires ont permis de déterminer que la différence de fluorescence entre les réactions positives et les réactions négatives était plus importante lorsque l'amplification impliquait une faible concentration d'amorces spécifiques et que la détection finale était faite avec une forte concentration de SYBR Green (résultats non montrés).

Un essai a été effectué pour s'assurer que la méthodologie de mesure de la fluorescence était quantitativement représentative de l'abondance des amplicons nPCR spécifiques générés dans le produit final. La méthode a été appliquée à l'analyse d'amplicons consensuels humains dilués en série (Section 2.5) puis amplifiés avec la paire d'amorces spécifiques à l'humain (Section 2.4.4). Pour quantifier le rendement des différentes réactions d'amplification, la fluorescence relative a été calculée selon le rapport entre la fluorescence mesurée et la fluorescence du contrôle négatif (Figure 3.15). Tel qu'attendu, plus la concentration initiale d'ADN matrice était grande, plus la réaction avait atteint une étape avancée de la cinétique d'amplification PCR à la fin des 35 cycles. En effet, il en a résulté un profil de fluorescence similaire à celui observé lors de l'analyse en temps réel d'une même réaction (Figure 3.10). La méthodologie alternative a aussi été appliquée à la

détection spécifique de l'ADNmt dans les eaux usées de la station de traitement de Rosemère-Lorraine (Figure 3.16). Les réactions dont la fluorescence excédait le seuil arbitraire de 3 ont été considérées positives. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus précédemment par la méthodologie d'amplification nPCR en temps réel (Figure 3.7). Cette fois-ci, les marqueurs mitochondriaux de l'humain, du porc, du bœuf et du cheval ont aussi été détectés mais pas ceux du coq. En fait, les réactions spécifiques au coq, à la caille et au goéland étaient problématiques puisque la fluorescence finale de leurs contrôles positifs n'excédait pas significativement la fluorescence non spécifique mesurée dans leurs contrôles négatifs. La reprise de l'essai pour ces espèces a donné des résultats similaires (résultats non montrés).

Puisque les amorces spécifiques conçues pour ce projet n'étaient pas toutes compatibles avec la stratégie de détection du produit d'amplification final par lecture de fluorescence, cette méthodologie n'a pas été adoptée pour l'analyse des eaux de surface.

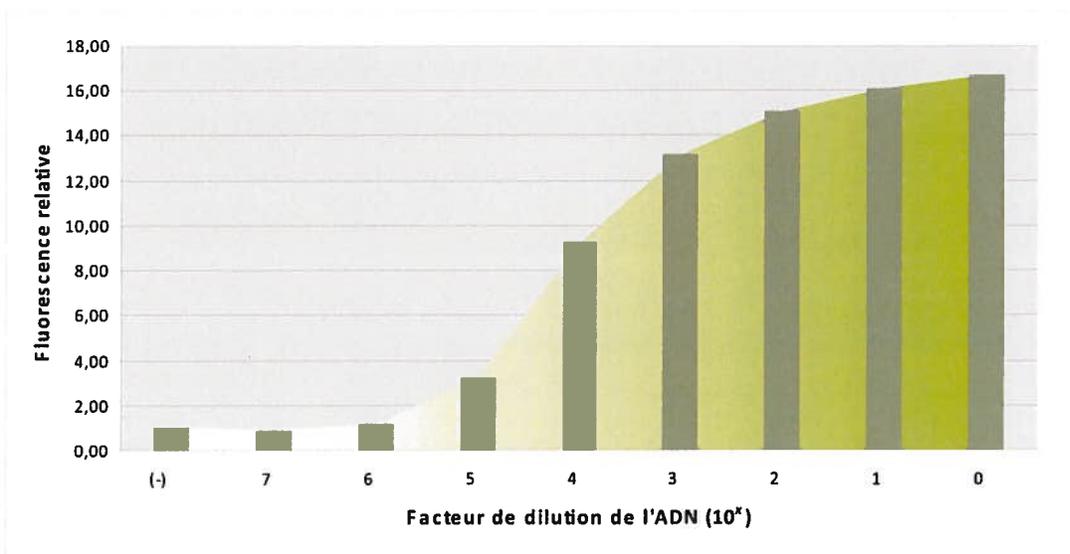


Figure 3.15

Fluorescence relative des produits d'amplification nPCR par les amorces spécifiques à l'humain à partir d'amplicons consensuels humains dilués en série.

Fluorescence relative = F/F_0 où F est la fluorescence mesurée et F_0 est la fluorescence du contrôle négatif. $\lambda_{\text{excitation}} = 485 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 520 \text{ nm}$.

(-) : Contrôle négatif

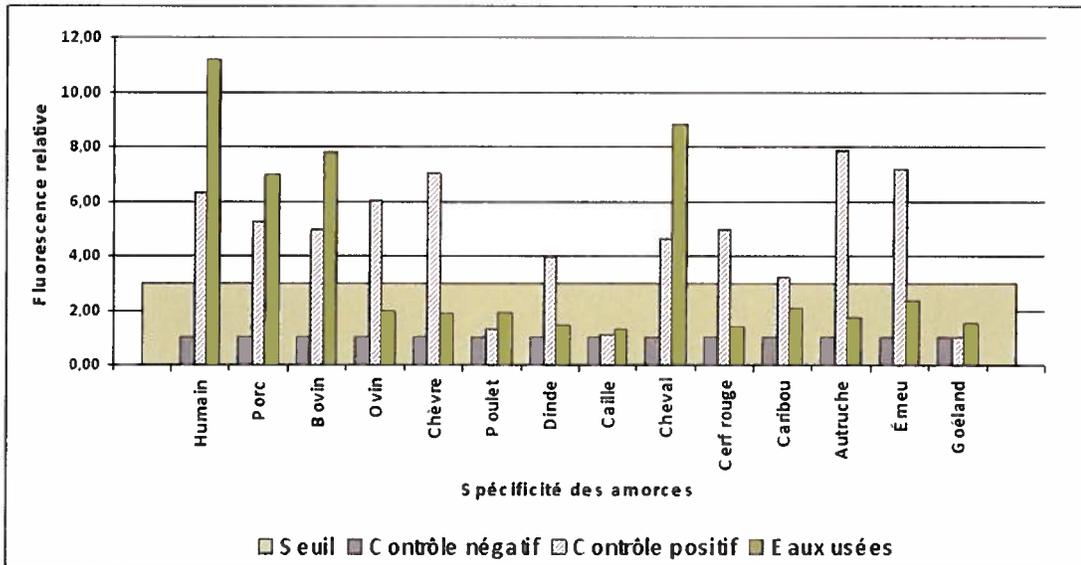


Figure 3.16

Fluorescence relative des produits d'amplification nPCR de l'ADN extrait des eaux usées de la station de traitement de Rosemère-Lorraine par chacune des paires d'amorces spécifiques.

Les termes « bovin », « ovin » et « poulet » correspondent respectivement au bœuf, au mouton et au coq. Fluorescence relative = F/F_0 où F est la fluorescence mesurée et F_0 est la fluorescence du contrôle négatif. $\lambda_{\text{excitation}} = 485 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 520 \text{ nm}$.

3.5 Analyse des eaux de surface du bassin versant de la rivière l'Assomption

3.5.1 Échantillonnage et préparation des échantillons d'eau de surface

Les campagnes de juin 2008 et d'octobre 2009 comprenaient respectivement 49 et 51 sites d'échantillonnage numérotés et répartis sur le territoire du bassin versant de la rivière l'Assomption (BVRA) (Figure 3.24). Les sites ont été sélectionnés et échantillonnés en collaboration avec les géomaticiens François Paradis (2008) et Francis Lajoie (2009) de la Corporation de l'aménagement de la rivière l'Assomption (CARA). Les informations concernant les dates d'échantillonnage, les coordonnées géographiques, la municipalité, le cours d'eau ainsi que l'environnement à proximité du site d'échantillonnage ont été récoltées à partir de données géographiques, de photographies aériennes et d'observations sur le terrain (Annexe B).

Pour chaque échantillon, des portions ont été filtrées pour en conserver le rétentat (Sections 2.1.1.3 et 2.1.2). Les volumes filtrés ont varié d'un échantillon à l'autre, probablement en raison de la saturation plus ou moins rapide du filtre dépendamment de la concentration et de la taille des matières en suspension. La turbidité des échantillons prélevés en 2009 a été mesurée à la demande des collaborateurs de la CARA (Tableau C.111). Ce paramètre est inclus dans les recommandations au sujet de la qualité des eaux utilisées à des fins récréatives au Canada où la limite maximale suggérée est de 50 unités de turbidité néphélométrique (UTN) et vise à assurer une visibilité adéquate et sécuritaire des baigneurs et des sauveteurs (Santé et Bien-être social Canada 1992). Les échantillons 13 et 48 excédaient cette limite avec des valeurs de turbidité respectives de 60,30 UTN et 135,00 UTN.

Le rétentat de filtration contenait potentiellement des cellules épithéliales intestinales ou certains de leurs constituants (comme les mitochondries) libérés dans l'eau via les fèces des animaux responsables de la contamination fécale au site d'échantillonnage. Pour chaque échantillon, l'ADN total du rétentat a été extrait avec l'ensemble FastDNA SPIN (Section 2.1.3). Les produits d'extraction ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 3.17) et analysés par spectrophotométrie (Tableau 3.111 et Annexe C), tel qu'expliqué précédemment (Section 3.1.1). Afin d'économiser les produits

d'extraction des séries de filtration B, ceux-ci n'ont pas été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour les séries A, l'intégrité des produits d'extraction a semblé satisfaisante quoique certains échantillons aient présentés une trainée de faible poids moléculaire, généralement indicatrice de dégradation. Quoique l'intensité des bandes d'ADN de 2008 semble supérieure à celles de 2009, cela est attribuable à une variation dans la coloration des gels et non à la quantité d'ADN migré. En réalité, les concentrations d'ADN calculées par spectrophotométrie étaient similaires pour les réplicats des deux années avec des valeurs moyennes de 24,44 ng/μl et 28,56 ng/μl en 2008 et de 24,96 ng/μl et 19,36 ng/μl en 2009. Le ratio A_{260}/A_{280} était en moyenne de 1,53 et 1,47 en 2008 et de 1,50 et 1,36 en 2009. Le ratio A_{260}/A_{230} était en moyenne de 0,91 et 0,34 en 2008 et de 0,55 et 0,66 en 2009. Ces faibles ratios d'absorbance indiquaient la présence d'impuretés tel que détaillé à la section 3.3.1.

En plus d'être contaminé par les résidus des réactifs d'extraction, les ADN obtenus à partir d'eaux de surface étaient susceptibles de contenir des acides humiques co-extraits qui sont d'importants inhibiteurs de l'ADN polymérase. Malgré l'hétérogénéité de leur structure moléculaire, ces contaminants ont souvent été quantifiés par spectrophotométrie. Le présent protocole a considéré l'absorbance à 340 nm (A_{340}) puisqu'elle a fréquemment été citée dans la littérature (Lakay *et al.* 2007; Caldwell et Levine 2009) et que cette mesure était automatiquement enregistrée à chaque lecture du spectrophotomètre NanoDrop™ ND-1000 lors de la correction « bichromatique » qui soustrayait automatiquement la valeur A_{340} à tout le spectre d'absorbance (Thermo Fisher Scientific 2008). Arbeli et Fuentes ont étudié la relation entre la quantité d'acides humiques co-extraits et l'inhibition de l'amplification PCR et ils ont démontré qu'à environ $A_{320} > 0,2$ l'obtention d'un produit d'amplification était compromise (Arbeli et Fuentes 2007). Pour ces raisons, certains produits d'extraction ont été purifiés à plusieurs reprises sur colonnes de PVPP de façon à éliminer les acides humiques jusqu'à l'obtention d'une A_{340} inférieure ou égale à 0,2. En moyenne, moins de purifications ont été nécessaires pour les échantillons 2008-A (1,6) et 2008-B (1,2) dont la filtration était limitée à un volume de 350 ml ou encore pour les échantillons 2009-B (1,3) qui ont été purifiés avec des colonnes plus épaisses. Les échantillons ayant nécessité le plus de passages sur PVPP ont été ceux de 2009-A (en moyenne 2,8). Néanmoins, les produits de purification finaux de

2008-A, 2008-B, 2009-A et 2009-B ont présenté des taux de pureté acceptables avec des valeurs moyennes d' A_{340} respectives de 0,106, 0,091, 0,111 et 0,060.

Pour s'assurer que les produits d'extraction étaient exempts d'inhibiteurs de l'ADN polymérase, tous les échantillons ont été soumis à une amplification par des amorces universelles pour le gène de l'ARNr 16S bactérien. Puisque l'ADN total provenant des eaux de surface contenait nécessairement de l'ADN bactérien, un résultat négatif d'amplification du gène de l'ARNr 16S a été imputé à la présence d'inhibiteurs de l'amplification PCR (identifié en souligné bleu dans la Figure 3.18). Dans ce cas, le produit d'extraction d'ADN a subi une purification supplémentaire sur PVPP ou une dilution avec de l'eau ultrapure stérile avant de répéter l'essai d'amplification. Certains échantillons ont semblé présenter de l'inhibition même après plusieurs purifications mais ont néanmoins été conservés tels quels en raison des pertes d'ADN résultant de chaque passage supplémentaire sur colonne de PVPP (identifiés en souligné bleu dans la Figure 3.19).

Tableau 3.III

Moyenne des passages sur PVPP et des lectures de spectrophotométrie de l'ADN total extrait des échantillons d'eau de surface récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption.

| Échantillonnage | Filtration | Passages sur PVPP | Concentration d'ADN (ng/µl) | A ₃₄₀ finale | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ |
|-----------------|------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Juin 2008 | Série A | 1,6 | 24,44 | 0,106 | 0,91 | 1,53 |
| Juin 2008 | Série B | 1,2 | 28,56 | 0,091 | 0,34 | 1,47 |
| Octobre 2009 | Série A | 2,8 | 24,96 | 0,111 | 0,55 | 1,50 |
| Octobre 2009 | Série B | 1,3 | 19,36 | 0,060 | 0,66 | 1,36 |

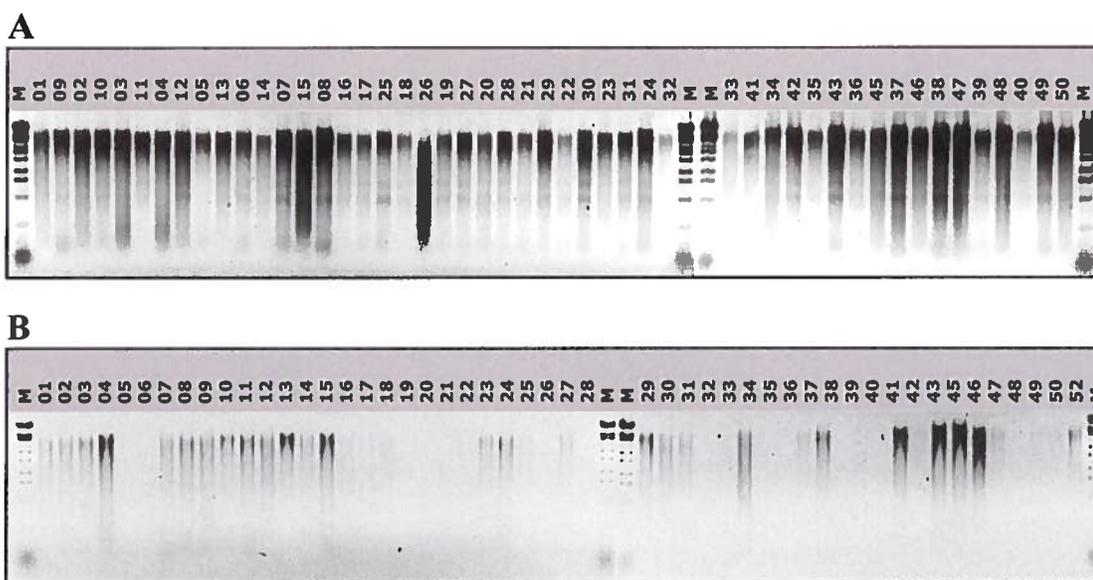


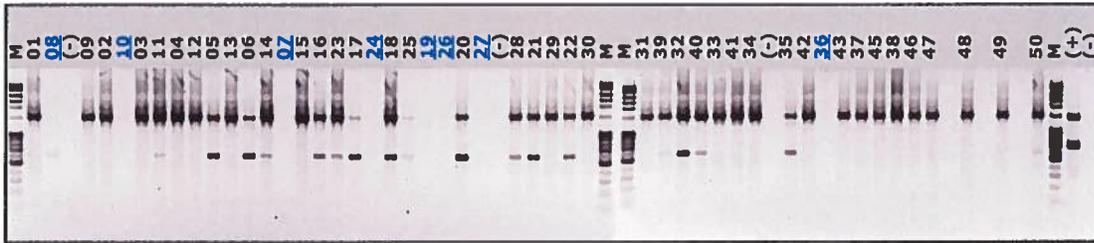
Figure 3.17

Produits d'extraction et de purification de l'ADN.

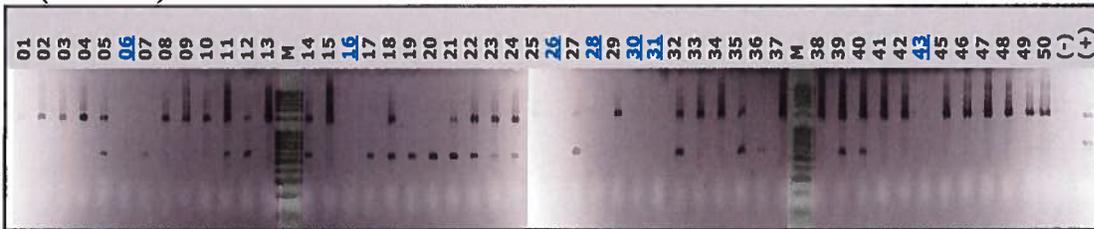
Électrophorèse sur gel d'agarose 1 % de 5 µl d'ADN purifié à partir des échantillons d'eau de surface récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption en juin 2008 (A) et en octobre 2009 (B), séries A. L'ADN extrait des séries de filtrations B n'a pas été visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose.

M : Marqueur de poids moléculaire ADN du phage Lambda digéré par l'enzyme StyI

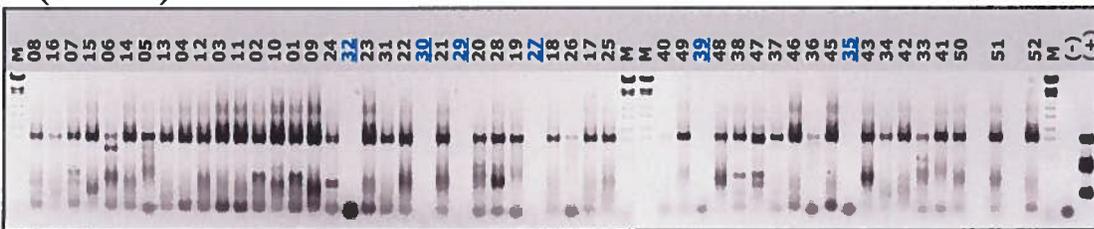
A (2008-A)



B (2008-B)



C (2009-A)



D (2009-B)

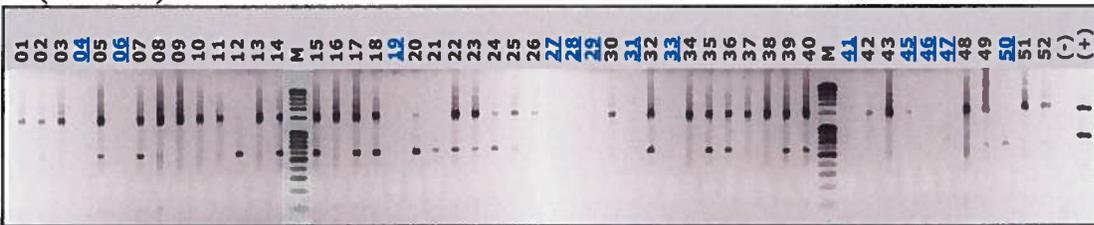


Figure 3.18

Amplification PCR du gène de l'ARNr 16S bactérien des échantillons d'eau de surface du bassin versant de la rivière l'Assomption.

Électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% de 5 µl des produits d'amplification PCR générés à partir de l'ADN purifié des échantillons d'eau de surface des séries 2008-A (A), 2008-B (B), 2009-A (C) et 2009-B (D).

Souligné bleu : échantillons pour lesquels on observe l'inhibition de l'amplification PCR

M : Marqueur de poids moléculaire exACTGene™ Mid Range Plus DNA ou ADN du phage Lambda digéré par l'enzyme StyI.

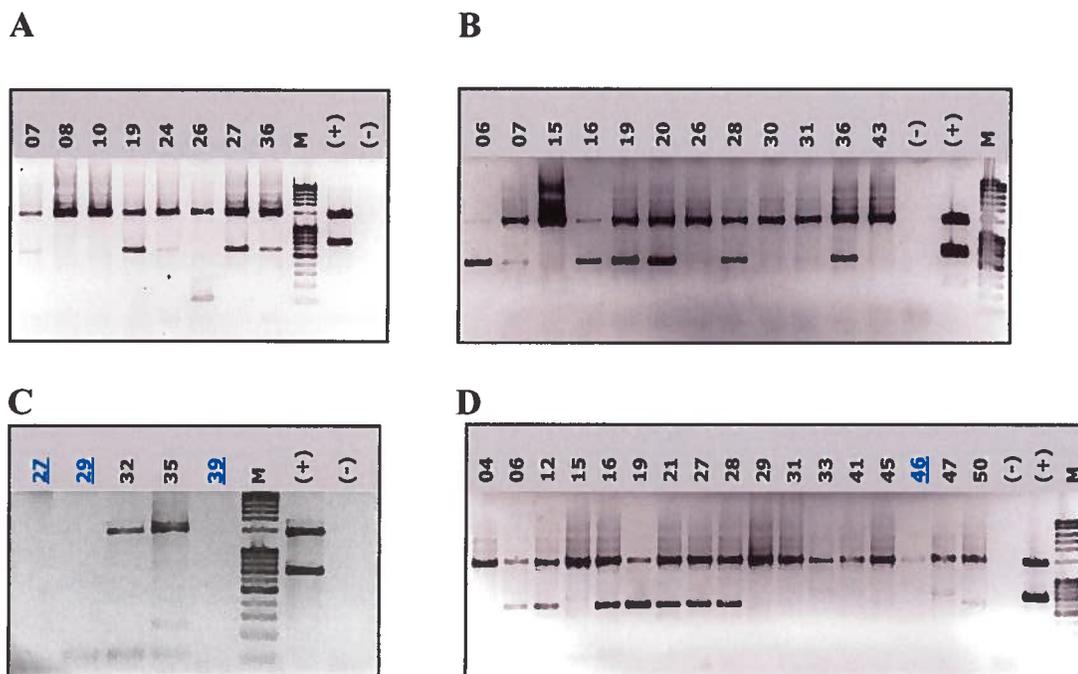


Figure 3.19

Reprise de l'amplification PCR du gène de l'ARNr 16S bactérien des échantillons du bassin versant de la rivière l'Assomption suite aux purifications supplémentaires.

Électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% de 5 µl des produits d'amplification PCR générés à partir de l'ADN purifié des échantillons d'eau de surface des séries 2008-A (A), 2008-B (B), 2009-A (C) et 2009-B (D).

Souligné bleu : échantillons pour lesquels on observe l'inhibition de l'amplification PCR

M : Marqueur de poids moléculaire exACTGene™ Mid Range Plus DNA

3.5.2 Amplifications PCR consensuelle et nPCR spécifique de l'ADN mitochondrial

L'ADN extrait et purifié des eaux de surface a été amplifié par PCR avec la paire d'amorces consensuelles M150 et selon la méthode optimisée (Figure 3.20). Ainsi, si un échantillon contenait l'ADN mitochondrial d'une ou plusieurs espèces animales, un fragment d'environ 2 kb serait amplifié, correspondant aux séquences partielles des gènes de l'ARNr 12S et de l'ARNr 16S (Figure 1.2). L'électrophorèse sur gel d'agarose a permis de visualiser une amplification de ce fragment M150 pour 34 des 49 échantillons prélevés en 2008 et pour seulement 2 des 51 échantillons prélevés en 2009. Plusieurs de ces bandes avaient une très faible intensité et il est important de noter qu'à cette étape de la méthode, des faux négatifs pouvaient résulter du fait que l'électrophorèse sur gel d'agarose permettait de visualiser l'ADN avec une sensibilité d'environ 10 ng mL^{-1} seulement (Waring 1965). L'absence de bande visible n'indiquait donc pas nécessairement l'absence d'ADN mitochondrial mais pouvait résulter d'une très faible quantité initiale dont l'amplification tardive aurait généré une faible concentration d'amplicons. Aussi, le filtrat de la purification des produits d'amplification PCR consensuelle a été visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose pour s'assurer qu'aucune perte significative d'amplicons n'avait eu lieu lors de l'ultrafiltration, ce qui fut le cas (Figure 3.21). L'ADN extrait des eaux usées de la station de traitement de Rosemère-Lorraine a été utilisé comme contrôle positif (+) et aucun ajout n'a été apporté au mélange réactionnel du contrôle négatif (-).

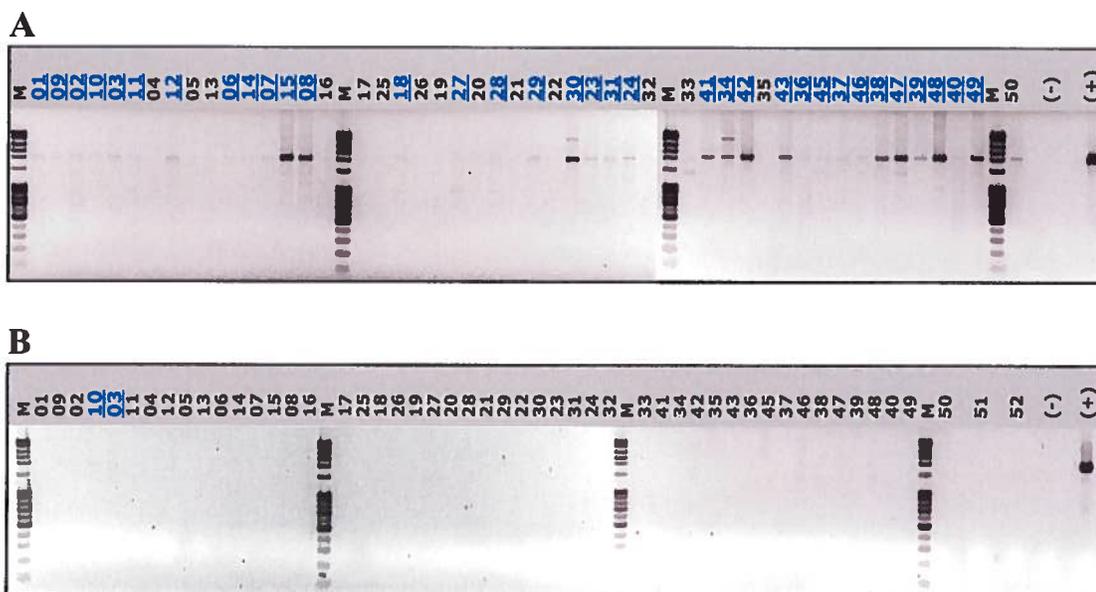


Figure 3.20

Amplification PCR consensuelle MI50 de l'ADN purifié des échantillons d'eau de surface.

Électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % de 5 μ l des produits d'amplification par les amorces consensuelles MI50 à partir d'ADN purifié des échantillons d'eau de surface récoltés en juin 2008 (A) et en octobre 2009 (B) dans le bassin versant de la rivière l'Assomption. Contrôle positif (+) : ADN extrait des eaux usées de la station de traitement de Rosemère-Lorraine. Contrôle négatif (-) : Aucun ajout au mélange réactionnel.

Souligné bleu : échantillons d'eau pour lesquels on observe une bande d'amplicons d'environ 2 kb. L'interprétation des résultats est basée sur la résolution de la photo originale.

M : Marqueur de poids moléculaire exACTGene™ Mid Range Plus DNA

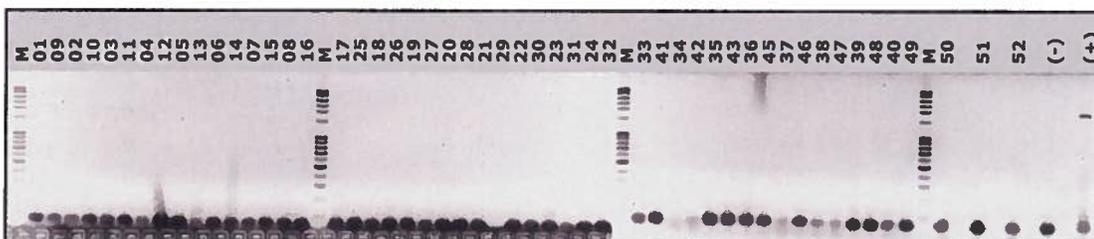


Figure 3.21

Filtrat de la purification des produits d'amplification PCR consensuelle MI50.

Électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % de 5 μ l du filtrat de la purification des produits d'amplification par les amorces consensuelles MI50 à partir d'ADN purifié des échantillons d'eau de surface récoltés en octobre 2009 dans le bassin versant de la rivière l'Assomption.

M : Marqueur de poids moléculaire exACTGene™ Mid Range Plus DNA

3.5.3 Identification des sources de contamination fécale

En juin 2008 et en octobre 2009, des échantillons d'eau de surface ont été récoltés à différents sites du bassin versant de la rivière l'Assomption (BVRA). La contamination fécale des échantillons a été quantifiée par un décompte de coliformes thermotolérants exprimé en unités formant colonie par 100 ml d'eau (UFC / 100 ml) (Section 2.2). En se basant sur les recommandations du ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs en matière de protection des activités récréatives et de l'esthétique (MDDEP 2009), les échantillons d'eau récoltés ont été classifiés selon trois niveaux de contamination fécale. Le nombre de site ayant un taux de contamination fécale acceptable (200 UFC / 100 ml ou moins) était de 23 en 2008 et de 23 en 2009 (incluant 2 sites non analysés en 2008) (Tableau 3.V). Le nombre de sites qui excédaient la limite pour les usages de contact primaire comme la baignade et la planche à voile (201 à 1000 UFC / 100 ml) était de 20 en 2008 et de 16 en 2009. Finalement, le nombre de sites qui excédaient la limite pour les usages de contact secondaire comme la pêche sportive et le canotage (plus de 1000 UFC / 100 ml) était de 6 en 2008 et de 12 en 2009. Une représentation géographique de ces résultats montre une tendance à retrouver des faibles taux de contamination au nord du territoire alors que des taux plus élevés ont été mesurés dans les cours d'eau situés au sud (Figure 3.24).

Pour chaque échantillon d'eau de surface, deux volumes d'eau ont été filtrés et l'ADN extrait du rétentat a été analysé à l'aide de la méthode d'amplification nPCR en temps réel mise au point dans le cadre du présent projet. Pour les échantillons prélevés en 2008, un dépistage spécifique de l'ADNmt a été effectué pour toutes les espèces animales ciblées par l'étude puis des répliquats d'analyse ont été effectués pour certaines espèces ou certains échantillons seulement (Figure 3.22). Pour les échantillons prélevés en 2009, le dépistage spécifique de l'ADNmt a été effectué pour six espèces dont celles ayant été retrouvées dans ceux de 2008, soit l'humain, le porc, le bœuf, le mouton et le coq, ainsi que pour la chèvre. Ensuite, des répliquats d'analyse ont été effectués pour les échantillons et les espèces ayant présenté un résultat positif seulement (Figure 3.23). Ces échantillons ont aussi subi une série d'analyses effectuées en appliquant la méthode de détection de l'ADNmt précédemment développée par Randa Kortbaoui (Section 2.4.5 et Tableau 3.IV). Il a été constaté que cette dernière méthode a généré beaucoup plus de résultats positifs (27 au

total) que notre méthode (8 au total), suggérant une meilleure sensibilité. Les résultats d'analyses microbiologiques et biomoléculaires du BVRA ont été détaillés dans le Tableau 3.V. Une représentation géographique a aussi été préparée pour localiser les résultats des analyses des marqueurs mitochondriaux. Ceux-ci ont été détectés pour l'humain dans 24 sites en 2008 et 20 sites en 2009 (Figure 3.25); pour le porc dans 2 sites en 2008 et aucun site en 2009 (Figure 3.26); pour le bœuf dans 3 sites en 2008 et 1 site en 2009 (Figure 3.27); pour le mouton dans 1 site en 2008 et aucun site en 2009 (Figure 3.28); et pour le coq dans 1 site en 2008 et aucun site en 2009 (Figure 3.29). Nous avons donc constaté un plus grand nombre de détections positives dans les échantillons de juin 2008 que dans ceux prélevés en octobre 2009.

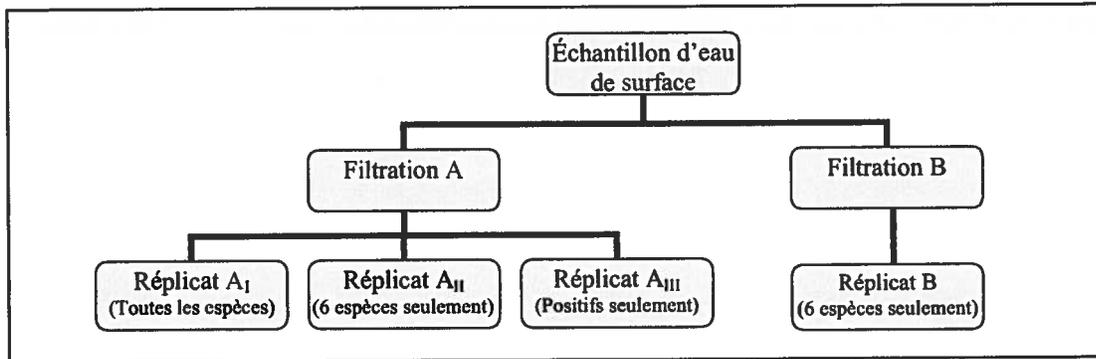


Figure 3.22

Réplicats d'analyse effectués pour chaque échantillon prélevé en 2008.

Les six (6) espèces sont l'humain, le porc, le bœuf, le mouton, la chèvre et le coq.

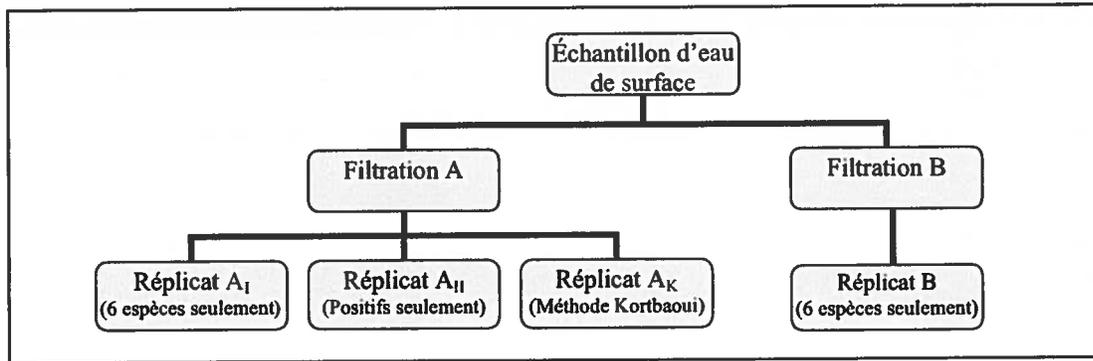


Figure 3.23

Réplicats d'analyse effectués pour chaque échantillon prélevé en 2009.

Les six (6) espèces sont l'humain, le porc, le bœuf, le mouton, la chèvre et le coq.

Tableau 3.IV

Comparaison des résultats positifs d'analyse des échantillons BVRA 2009-A par deux différentes méthodes de détection spécifique des marqueurs mitochondriaux.

| Espèce détectée | Échantillons positifs pour chaque méthode | | |
|-----------------|--|------------------------|------------------------------|
| | R. Kortbaoui seulement | M. Imbeau seulement | R. Kortbaoui et M. Imbeau |
| Humain | 08, 13, 15, 21, 24, 30, 31, 34, 38, 40, 43, 46, 51, 52. | 07, 12. | 02, 03, 11, 42, 45. |
| Porc | 02 | Aucun | Aucun |
| Bœuf | 02, 08, 10, 11, 45 | 47 | Aucun |
| Mouton | Aucun | Aucun | Aucun |
| Coq | 03, 11. | Aucun | Aucun |

Tableau 3.V
Analyse microbiologique et biomoléculaire des eaux de surface du bassin versant de la rivière l'Assomption

| Bassin versant | Station | Date (a-m-j) | Coliformes thermotolérants (UFC / 100 ml) | Détection de l'ADNmt (analyses positives / analyses totales) | | | | | | | |
|----------------|---------|--------------|---|--|------|------|--------|--------|-----|---------------------|-----|
| | | | | Humain | Porc | Bœuf | Mouton | Chèvre | Coq | Autres ³ | |
| BVRA | 01 | 2008-06-09 | 130 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 01 | 2009-10-02 | 260 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 02 | 2008-06-09 | 495 | 1/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 1/4 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 02 | 2009-10-02 | 1960 | 1/3 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 03 | 2008-06-09 | 1750 | 2/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 03 | 2009-09-30 | 3620 | 2/3 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 04 | 2008-06-09 | 870 | 0/2 | 0/3 | 1/4 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 04 | 2009-10-02 | 320 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 05 | 2008-06-11 | 38 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 05 | 2009-10-01 | 18 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 06 | 2008-06-11 | 110 | 1/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 06 | 2009-10-01 | 50 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 07 | 2008-06-11 | 1200 | 2/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 07 | 2009-10-01 | 820 | 1/3 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 08 | 2008-06-11 | 515 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 1/4 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 08 | 2009-10-01 | 1100 | 1/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 09 | 2008-06-10 | 160 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 09 | 2009-09-30 | 1160 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 10 | 2008-06-10 | 112 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 10 | 2009-09-30 | 440 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 11 | 2008-06-10 | 235 | 2/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 11 | 2009-09-30 | 17800 | 1/3 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 12 | 2008-06-09 | 950 | 1/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 12 | 2009-09-30 | 1220 | 1/3 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 13 | 2008-06-09 | 1115 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 13 | 2009-09-30 | 620 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |

³ Les « autres » espèces incluent la dinde, la caille, le cheval, le cerf rouge, le caribou, l'autruche, l'émeu et le goéland.

Tableau 3.V
Analyse microbiologique et biomoléculaire des eaux de surface du bassin versant de la rivière l'Assomption

| Bassin versant | Station | Date (a-m-j) | Coliformes thermotolérants (UFC / 100 ml) | Détection de l'ADNmt (analyses positives / analyses totales) | | | | | | |
|----------------|---------|--------------|---|--|------|------|--------|--------|-----|---------------------|
| | | | | Humain | Porc | Bœuf | Mouton | Chèvre | Coq | Autres ³ |
| BVRA | 28 | 2008-06-12 | 110 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 28 | 2009-09-29 | 200 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 29 | 2008-06-12 | 850 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 29 | 2009-09-29 | 960 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 30 | 2008-06-12 | 465 | 2/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 30 | 2009-09-29 | 200 | 1/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 31 | 2008-06-12 | 95 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 31 | 2009-09-29 | 16 | 1/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 32 | 2008-06-12 | 29 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 32 | 2009-09-29 | 70 | 1/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 33 | 2008-06-10 | 3050 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 33 | 2009-09-28 | 1320 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 34 | 2008-06-10 | 635 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 34 | 2009-09-28 | 4600 | 1/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 35 | 2008-06-12 | 43 | 2/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 35 | 2009-09-28 | 86 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 36 | 2008-06-12 | 85 | 1/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 36 | 2009-09-28 | 56 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 37 | 2008-06-09 | 525 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 37 | 2009-10-02 | 760 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 38 | 2008-06-09 | 260 | 2/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 38 | 2009-10-02 | 520 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 39 | 2008-06-13 | 45 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 39 | 2009-10-01 | 46 | 1/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 40 | 2008-06-13 | 47 | 0/2 | 1/4 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 40 | 2009-10-01 | 78 | 1/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 41 | 2008-06-10 | 170 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 41 | 2009-09-29 | 202 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |

Tableau 3.V
Analyse microbiologique et biomoléculaire des eaux de surface du bassin versant de la rivière l'Assomption

| Bassin versant | Station | Date (a-m-j) | Coliformes thermotolérants (UFC / 100 ml) | Détection de l'ADNmt (analyses positives / analyses totales) | | | | | | |
|---------------------------|-----------|--------------|---|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|
| | | | | Humain | Porc | Bœuf | Mouton | Chèvre | Coq | Autres ³ |
| BVRA | 42 | 2008-06-11 | 375 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 42 | 2009-10-01 | 174 | 1/3 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 43 | 2008-06-11 | 390 | 1/2 | 2/4 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 43 | 2009-10-01 | 166 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 45 | 2008-06-09 | 550 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 45 | 2009-09-30 | 1300 | 1/3 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 46 | 2008-06-09 | 128 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 46 | 2009-09-30 | 280 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 47 | 2008-06-10 | 1000 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 47 | 2009-09-30 | 1400 | 1/2 | 0/2 | 1/3 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 48 | 2008-06-10 | 1650 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 48 | 2009-09-30 | 560 | 1/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 49 | 2008-06-11 | 860 | 0/2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 49 | 2009-10-01 | 202 | 1/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 50 | 2008-06-09 | 795 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/1 |
| BVRA | 50 | 2009-09-30 | 1960 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 51 | 2009-10-02 | 182 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| BVRA | 52 | 2009-10-02 | 170 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/1 |
| Total 2008 | ND | ND | ND | 48/120 | 3/149 | 3/150 | 1/148 | 0/147 | 1/148 | 0/49 |
| Total 2009 | ND | ND | ND | 21/109 | 0/102 | 1/103 | 0/102 | 0/102 | 1/102 | 0/51 |
| Total des analyses | ND | ND | ND | 69/229 | 3/251 | 4/253 | 1/250 | 0/249 | 1/250 | 0/100 |

N.D. : Pas de résultats.

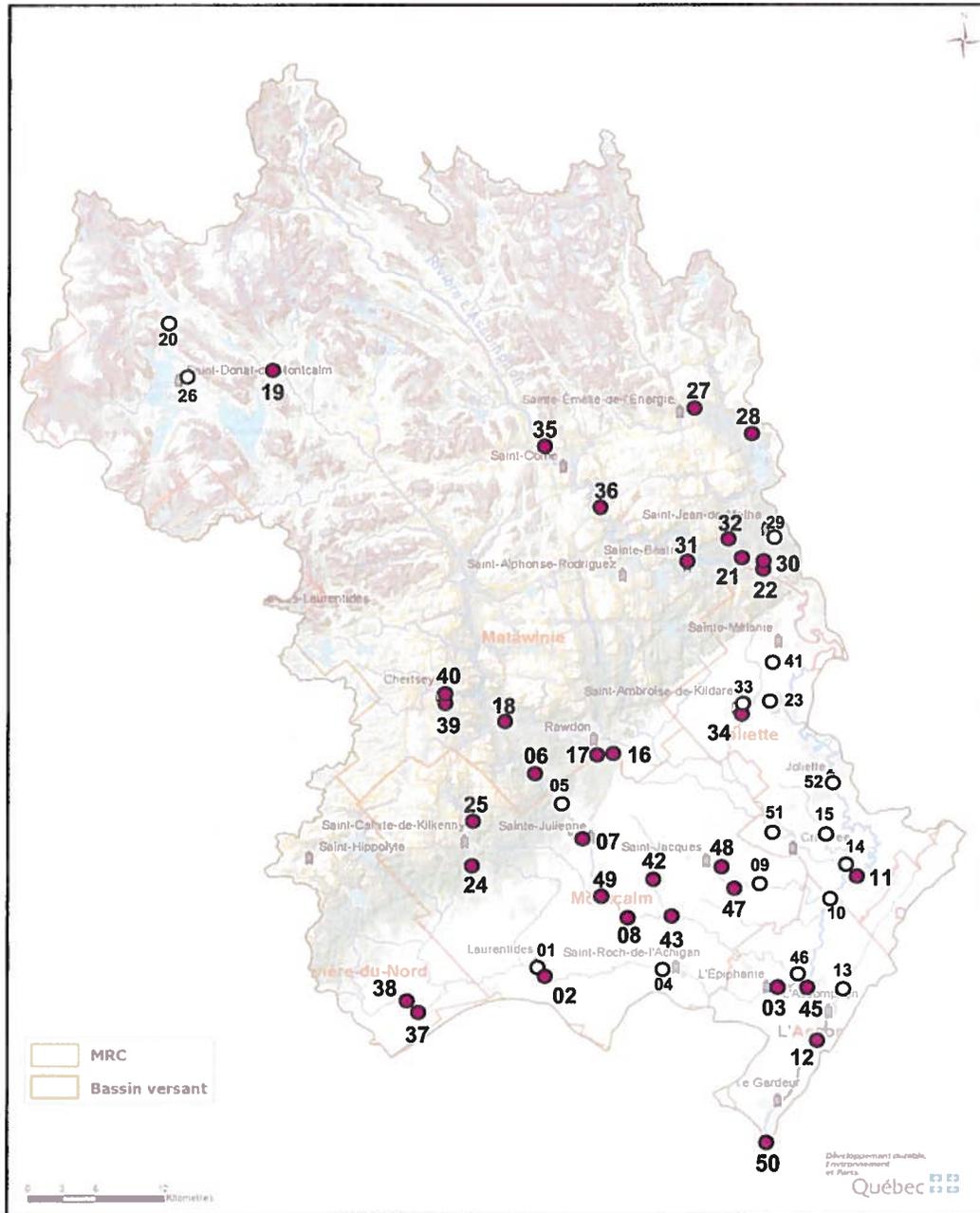


Figure 3.25

Localisation des marqueurs mitochondriaux humains détectés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption.

Les points blancs indiquent une absence de détection alors que les points colorés et les nombres surdimensionnés indiquent au moins une détection en 2008 ($n_{\text{positif}} = 24$) ou en 2009 ($n_{\text{positif}} = 20$).

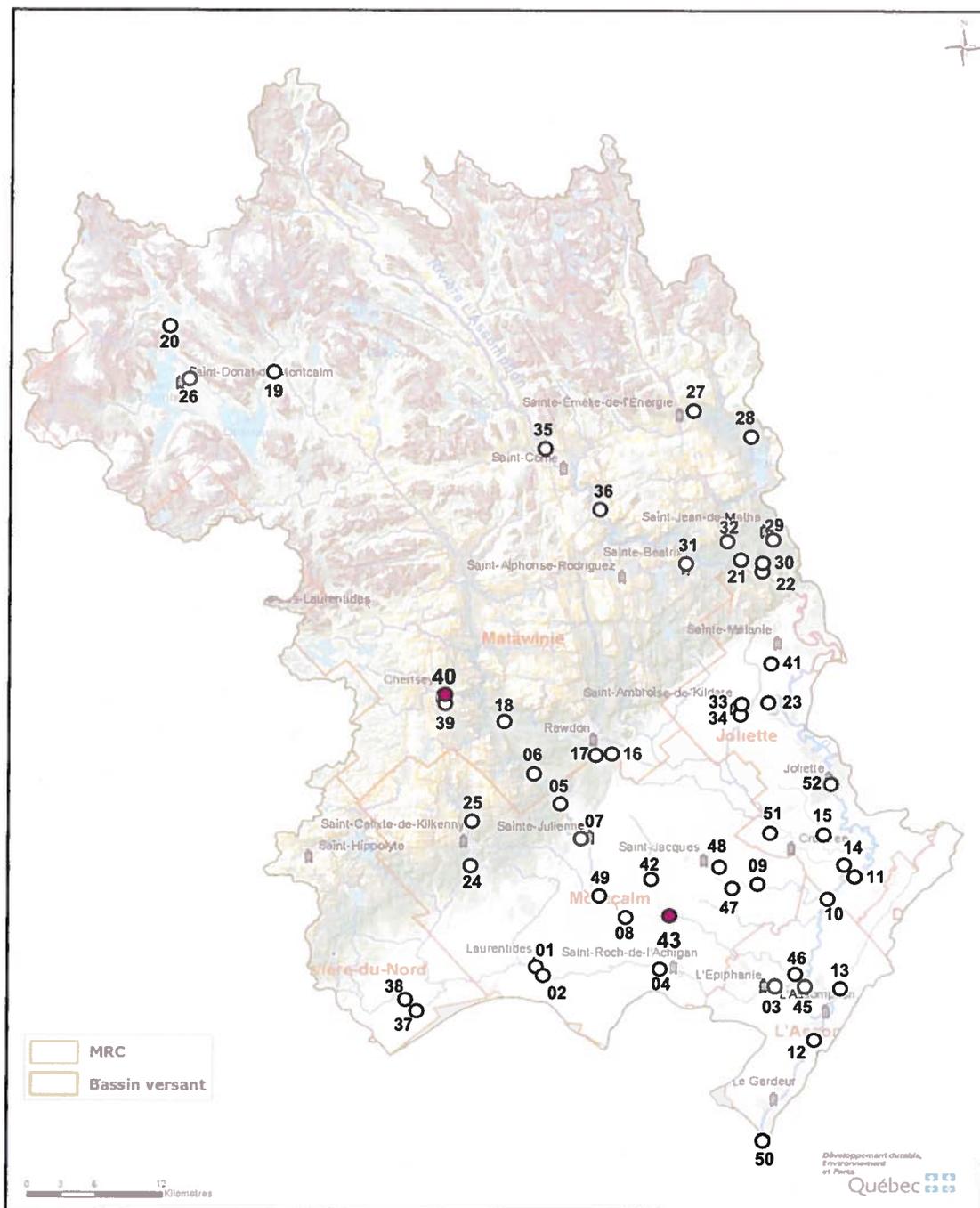


Figure 3.26

Localisation des marqueurs mitochondriaux porcins détectés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption.

Les points blancs indiquent une absence de détection alors que les points colorés et les nombres surdimensionnés indiquent au moins une détection en 2008 ($n_{\text{positif}} = 2$) ou en 2009 ($n_{\text{positif}} = 0$).

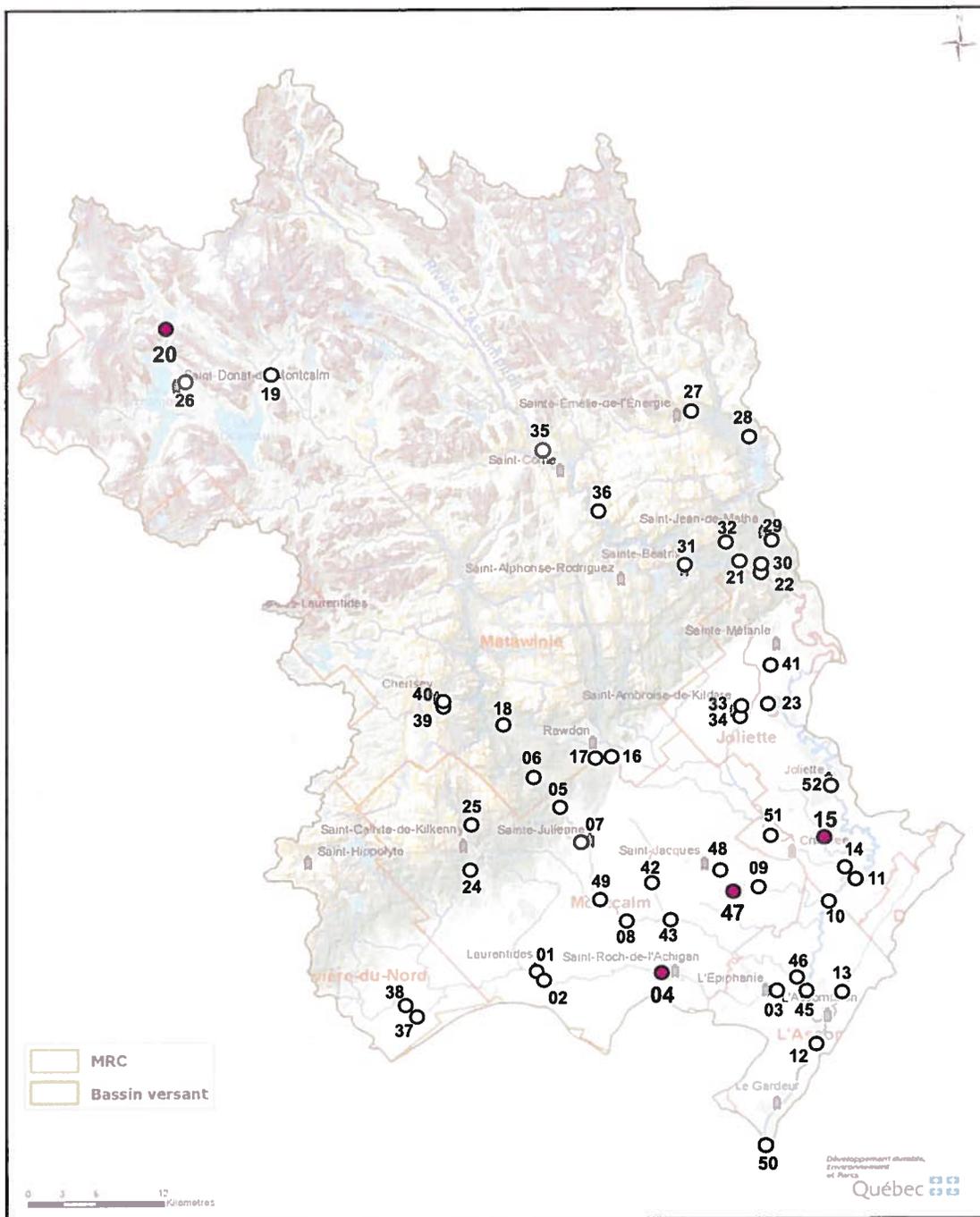


Figure 3.27

Localisation des marqueurs mitochondriaux de bœuf détectés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption.

Les points blancs indiquent une absence de détection alors que les points colorés et les nombres surdimensionnés indiquent au moins une détection en 2008 ($n_{positif} = 3$) ou en 2009 ($n_{positif} = 1$).

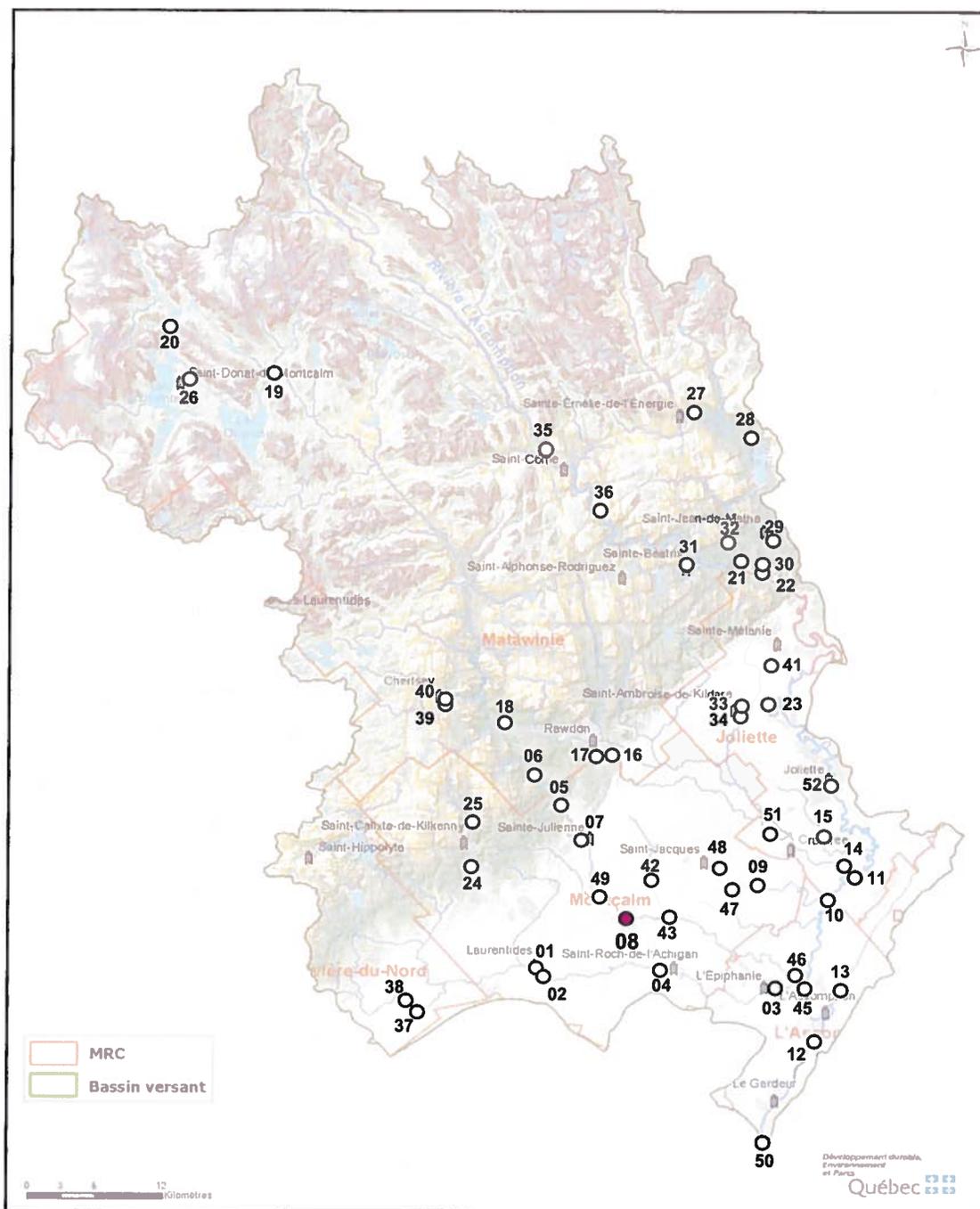


Figure 3.28

Localisation des marqueurs mitochondriaux de mouton détectés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption.

Les points blancs indiquent une absence de détection alors que le point coloré et le nombre surdimensionné indiquent au moins une détection en 2008 ($n_{\text{positif}} = 1$) ou en 2009 ($n_{\text{positif}} = 0$).

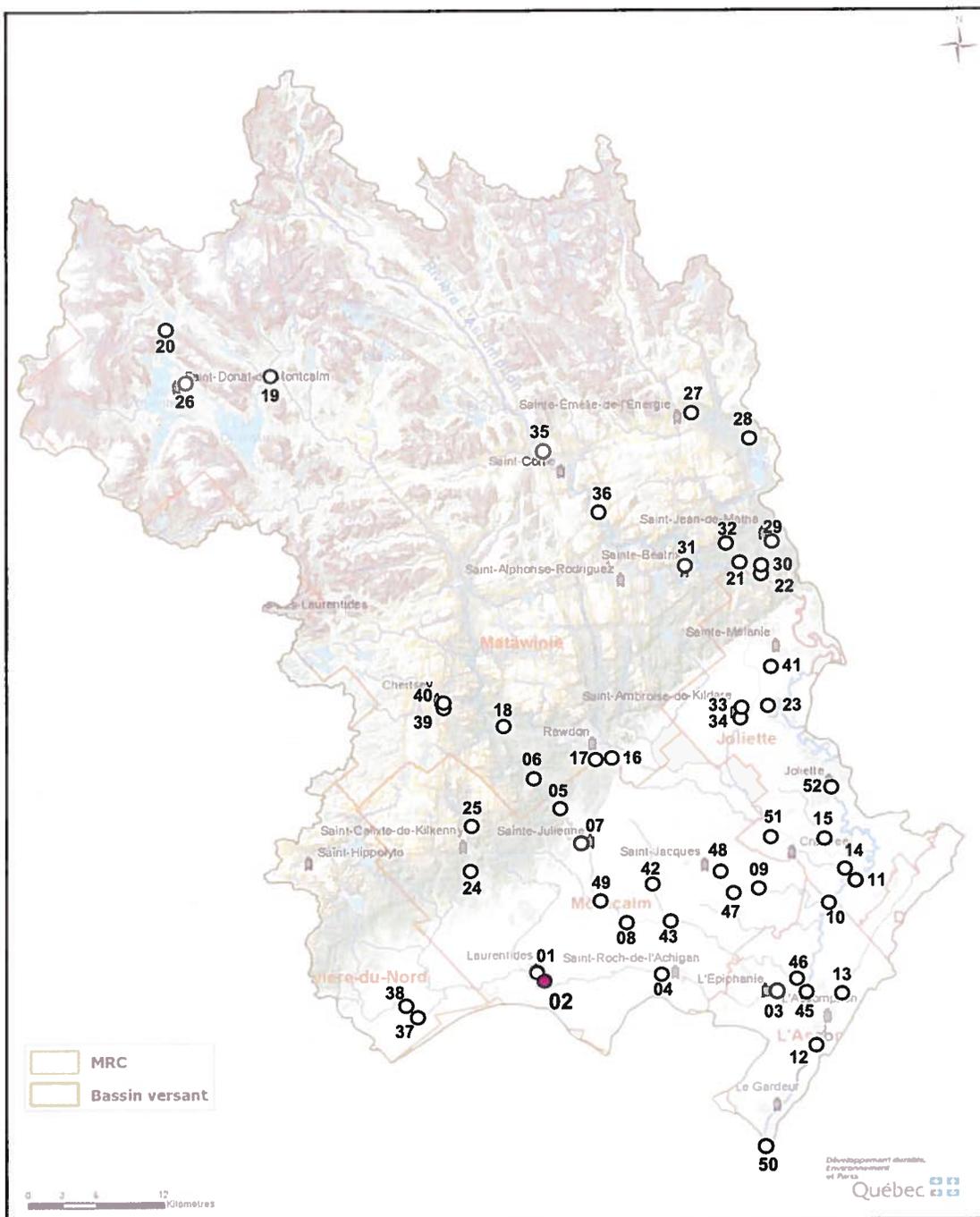


Figure 3.29

Localisation des marqueurs mitochondriaux de coq détectés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption.

Les points blancs indiquent une absence de détection alors que le point coloré et le nombre surdimensionné indiquent au moins une détection en 2008 ($n_{\text{positif}} = 1$) ou en 2009 ($n_{\text{positif}} = 0$).

3.6 Analyse des eaux de surface du bassin versant de la rivière South Nation

En 2004, 2005 et 2006, des échantillons d'eau de surface ont été récoltés à différents sites du bassin versant de la rivière South Nation (BVRSN) par nos collaborateurs d'Agriculture et Agroalimentaire Canada. La quantification et la classification de la contamination fécale de chaque échantillon a été effectuée d'une façon similaire à celle adoptée pour le BVRA et décrite précédemment (Section 3.5.3). Puisque chaque site a été échantillonné à des fréquences et à des périodes différentes, les résultats de concentration en coliformes thermotolérants ont été compilés en tenant compte de la moyenne des valeurs significatives mesurées à chaque endroit (Tableau 3.VI et Tableau 3.VII). Ainsi, un seul site avait un taux de contamination fécale acceptable (200 UFC / 100 ml ou moins), 9 sites excédaient la limite pour les usages de contact primaire (201 à 1000 UFC / 100 ml) et 12 sites excédaient la limite pour les usages de contact secondaire (plus de 1000 UFC / 100 ml). La représentation géographique de ces résultats permet de constater que plusieurs tributaires de la rivière South Nation situés dans différents secteurs du bassin versant sont fortement contaminés (Figure 3.30).

Nos collaborateurs ont aussi extrait l'ADN total de chaque échantillon et en ont fait parvenir une partie à notre laboratoire. Étant donné le faible volume disponible ($\leq 10 \mu\text{l}$), la spectrophotométrie et l'électrophorèse de ces produits d'extraction n'ont pas été effectuées. L'amplification du gène de l'ARNr 16S n'a pas non plus été exécutée dans notre laboratoire puisque nos collaborateurs ont fait des essais similaires et nous ont assuré que leurs échantillons d'ADN étaient exempts d'inhibiteurs de PCR. La méthode de détection par amplification nPCR en temps réel développée dans le présent projet a été utilisée pour y cribler la présence d'ADNmt de l'humain, du porc, du bœuf, du mouton, de la chèvre et du coq (Tableau 3.VI). En observant les résultats positifs obtenus pour les échantillons prélevés à un même site, il a été remarqué que la détection d'une espèce n'est pas constante dans le temps ou encore n'est pas reproductible d'une série d'échantillonnage à l'autre. Néanmoins, toutes années confondues, des marqueurs mitochondriaux ont été détectés à 13 sites pour l'humain (Figure 3.31), 3 sites pour le porc (Figure 3.32), 6 sites pour le bœuf (Figure 3.33) et 2 sites pour la chèvre (Figure 3.34).

Tableau 3.VI
Analyse microbiologique et biomoléculaire des eaux de surface du bassin versant de la rivière South Nation

| Bassin versant | Station | Date (a-m-j) | Coliformes thermotolérants (UFC / 100 ml) | Détection de l'ADNmt (analyses positives / analyses totales) | | | | | | |
|---------------------------|-----------|--------------|---|--|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|-------------|
| | | | | Humain | Porc | Beuf | Mouton | Chèvre | Coq | Autres |
| BVRSN | 21 | 2005-08-30 | 145000 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/0 |
| BVRSN | 21 | 2006-07-27 | TNTC | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/0 |
| BVRSN | 21 | 2006-08-08 | 2010 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/0 |
| BVRSN | 22 | 2005-06-15 | > 240000 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/1 | 0/0 |
| BVRSN | 22 | 2005-09-19 | 15200 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/0 |
| BVRSN | 22 | 2005-09-27 | 1630 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/0 |
| BVRSN | 22 | 2005-10-03 | 3640 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/0 |
| BVRSN | 22 | 2006-08-16 | 90000 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/0 |
| BVRSN | 23 | 2006-07-24 | 5000 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/0 |
| BVRSN | 23 | 2006-08-16 | < 10 | 0/1 | 0/1 | 1/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/0 |
| Total des analyses | ND | ND | ND | 19 /126 | 3 /126 | 12 /126 | 0 /126 | 2 /126 | 0 /126 | 0 /0 |

N.D. : Pas de résultats.

TNTC : Les colonies étaient trop nombreuses pour être comptées.

Tableau 3.VII
Moyenne des décomptes de coliformes thermotolérants des échantillons
d'eau de surface du bassin versant de la rivière South Nation.

| Station | Moyenne des coliformes thermotolérants (UFC / 100 ml) | Écart type |
|---------|--|------------|
| 1 | 2 | 3 |
| 2 | 611 | 490 |
| 3 | 2908 | 1708 |
| 4 | 5199 | 6330 |
| 5 | 983 | 375 |
| 6 | 480 | 198 |
| 7 | 680 | ND |
| 8 | 547 | 1023 |
| 9 | 5601 | 4500 |
| 10 | 1901 | 3858 |
| 11 | 294 | 216 |
| 12 | 727 | 452 |
| 13 | 918 | 381 |
| 14 | 13855 | 12126 |
| 15 | 4982 | 4847 |
| 16 | 778 | 869 |
| 17 | 602 | 376 |
| 18 | 6742 | 12927 |
| 19 | 1836 | 2843 |
| 20 | 1207 | 1299 |
| 21 | 37605 | 71598 |
| 22 | 27618 | 42016 |
| 23 | 5000 | ND |

ND : Un seul décompte significatif a été effectué à cette station.

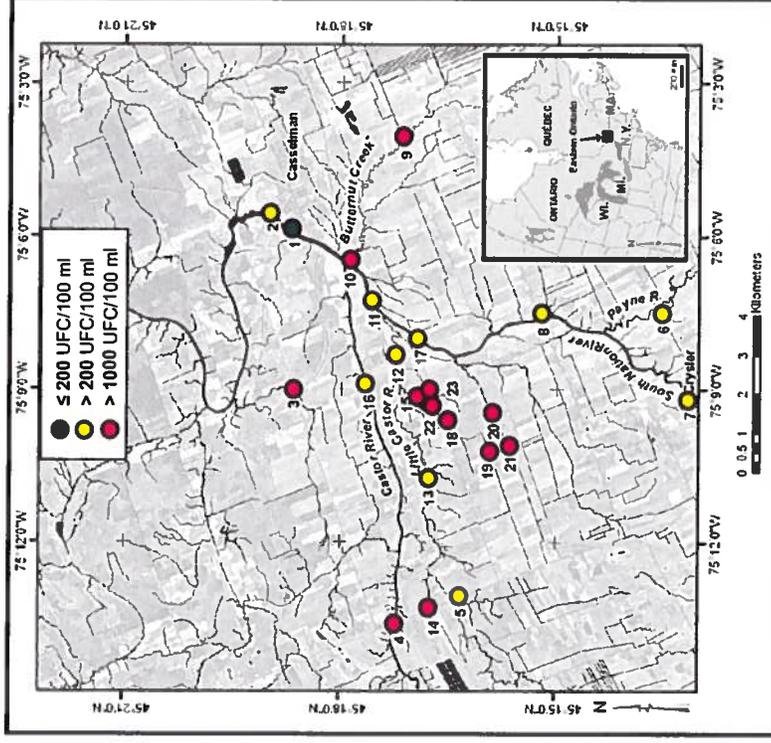


Figure 3.30
Taux de contamination fécale moyen des échantillons d'eau de
surface du bassin versant de la rivière South Nation.
 Le décompte de coliformes thermotolérants est représenté par un code
 de couleurs. Les valeurs sont détaillées dans les tableaux 3.VI et 3.VII.

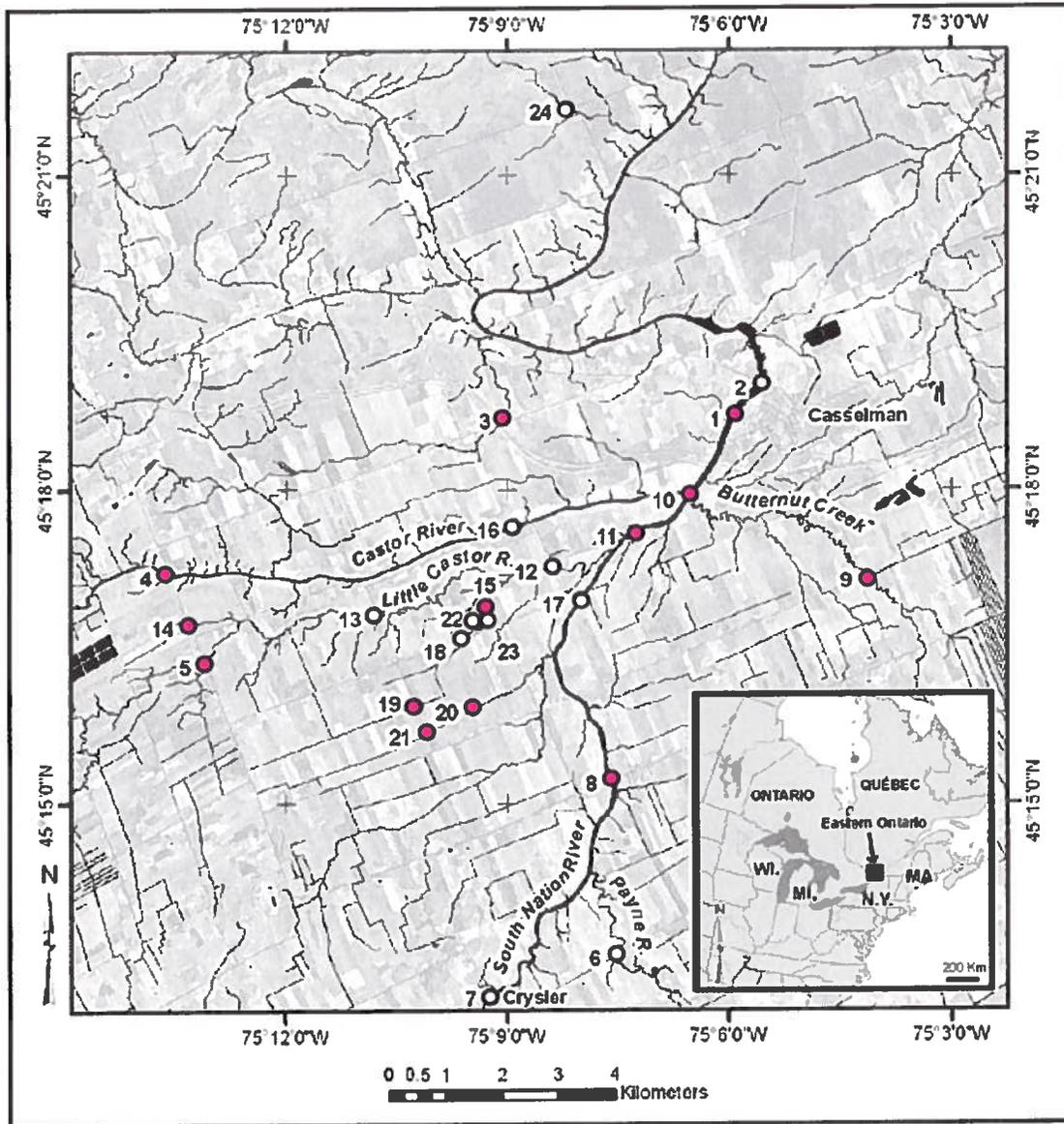


Figure 3.31

Localisation des marqueurs mitochondriaux humains détectés dans le bassin versant de la rivière South Nation.

Les points blancs indiquent une absence de détection alors que les points colorés indiquent au moins une détection en 2004, 2005 ou 2006.

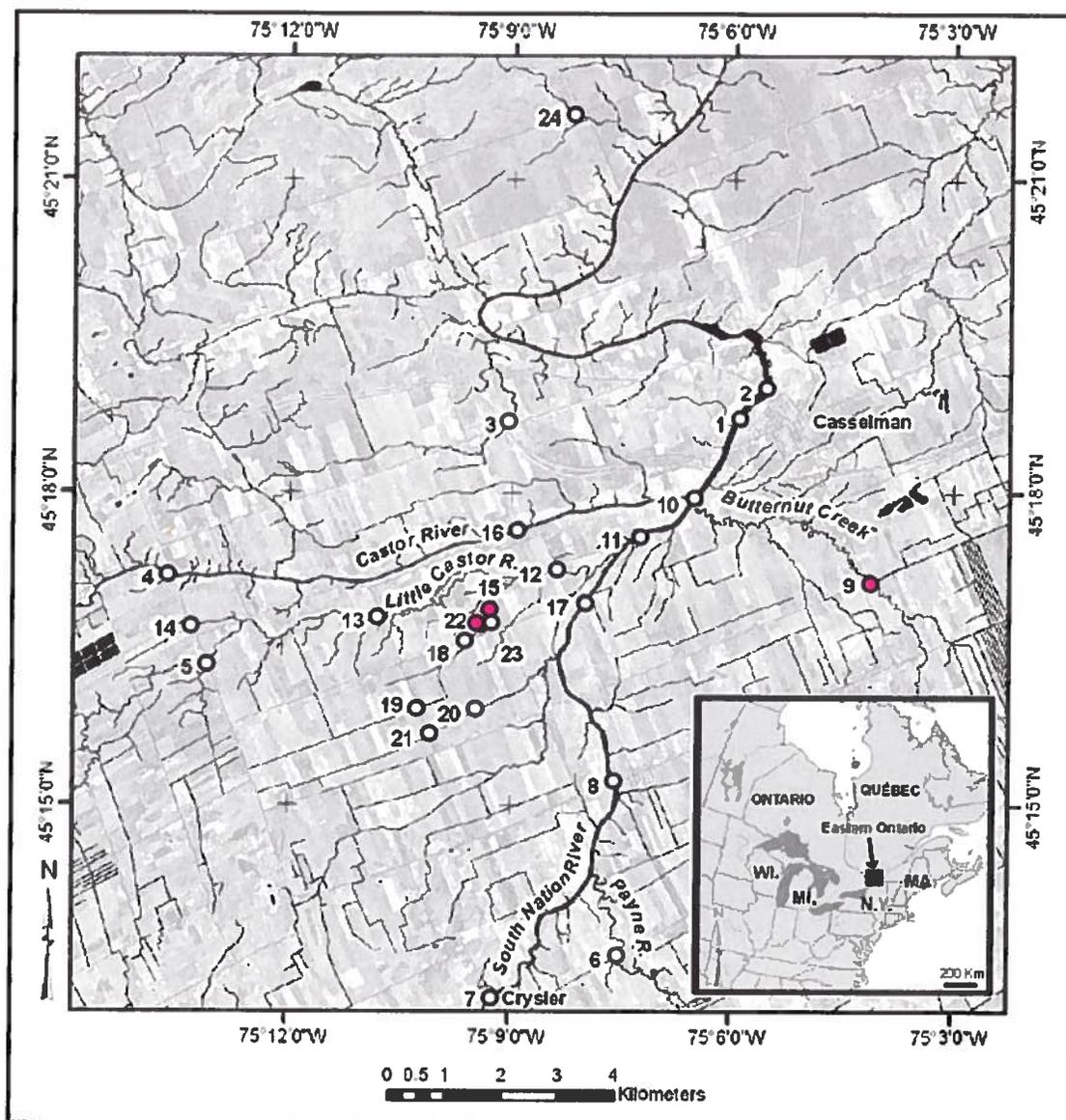


Figure 3.32

Localisation des marqueurs mitochondriaux porcins détectés dans le bassin versant de la rivière South Nation.

Les points blancs indiquent une absence de détection alors que les points colorés indiquent au moins une détection en 2004, 2005 ou 2006.

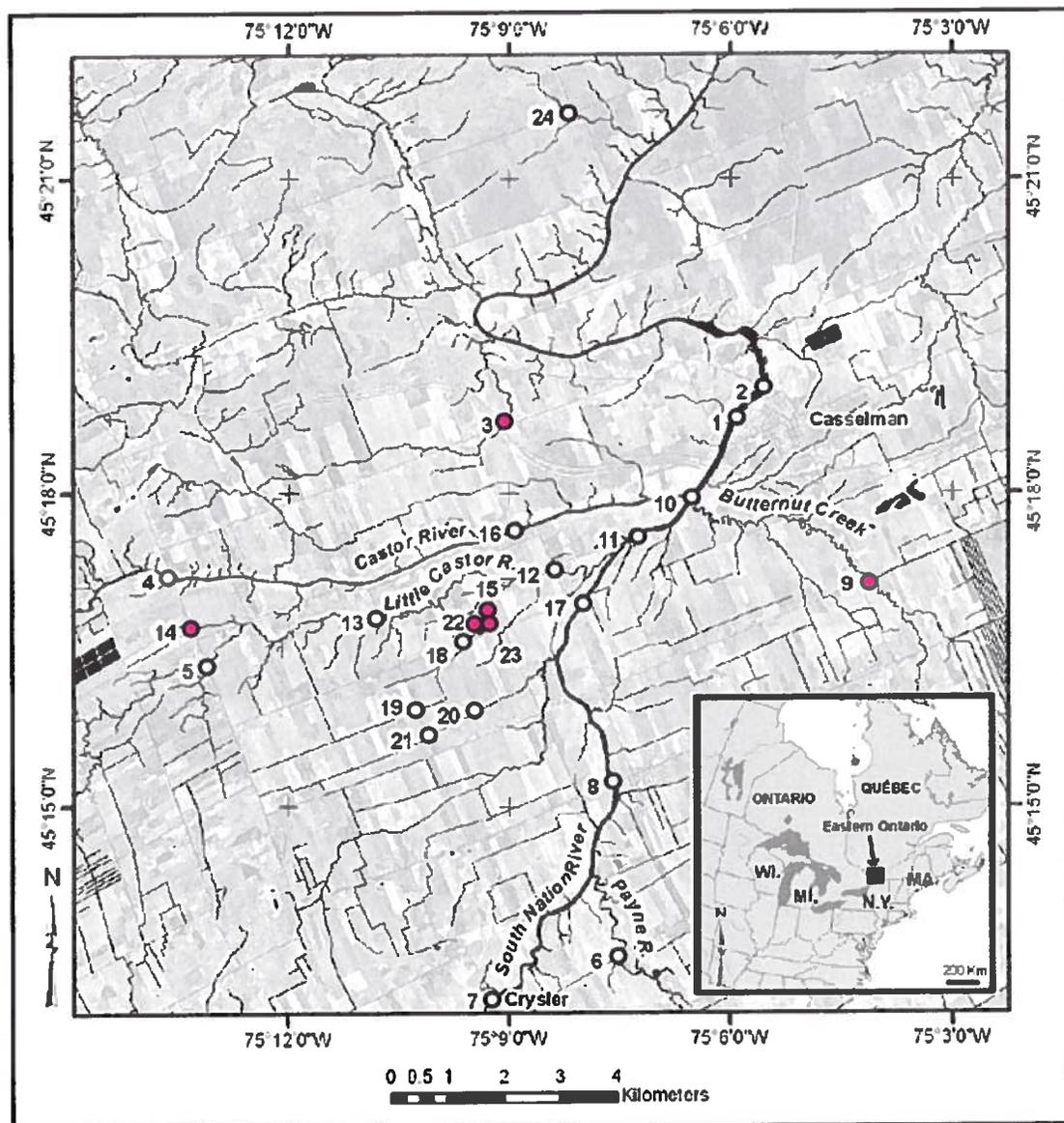


Figure 3.33

Localisation des marqueurs mitochondriaux de bœuf détectés dans le bassin versant de la rivière South Nation.

Les points blancs indiquent une absence de détection alors que les points colorés indiquent au moins une détection en 2004, 2005 ou 2006.

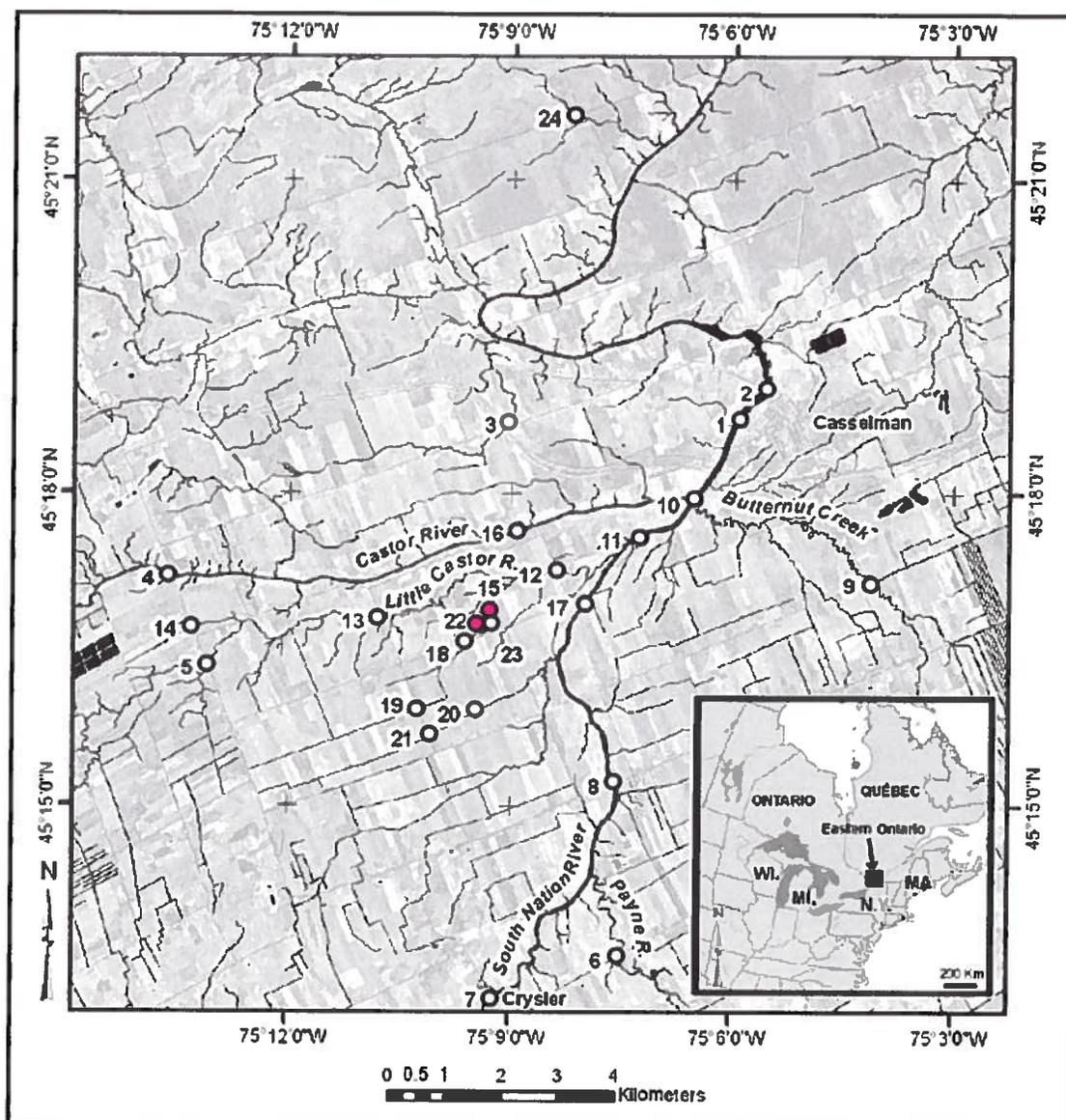


Figure 3.34

Localisation des marqueurs mitochondriaux de chèvre détectés dans le bassin versant de la rivière South Nation.

Les points blancs indiquent une absence de détection alors que les points colorés indiquent au moins une détection en 2004, 2005 ou 2006.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Au cours des dernières décennies, plusieurs méthodes de biologie moléculaire ont été mises au point pour identifier les sources de contamination fécale dans les eaux usées ou de surface. En plus de se distinguer par les technologies et les cibles auxquelles elles font appel, ces approches ont présenté différents niveaux de sensibilité et de spécificité. Il fut démontré à plusieurs reprises que la stratégie consistant à utiliser l'amplification PCR pour détecter le génome mitochondrial (ADNmt) comme marqueur spécifique de la contamination fécale permettait d'obtenir une sensibilité très satisfaisante ainsi qu'une excellente spécificité (Martellini *et al.* 2005; Caldwell *et al.* 2007; Schill et Mathes 2008; Baker-Austin *et al.* 2009; Caldwell et Levine 2009; Kortbaoui *et al.* 2009; Baker-Austin *et al.*). Pour améliorer davantage la sensibilité et la spécificité ainsi que la rapidité et l'accessibilité de cette approche, le présent projet de recherche consistait à développer une nouvelle méthodologie de détection spécifique de l'ADNmt en se basant sur l'amplification PCR nichée (nPCR) et en l'appliquant au criblage d'un grand nombre de sources animales dans des échantillons d'eau de surface récoltés à l'échelle d'un bassin versant.

4.1 Conception des amorces

4.1.1 Choix des espèces animales

Dans le cadre de cette étude, 14 espèces animales ont été ciblées, soit l'humain, le porc, le bœuf, le mouton, la chèvre, le coq, la dinde, la caille, le cheval, le cerf rouge, le caribou, l'autruche, l'émeu et le goéland. Il s'agissait d'espèces pouvant générer une forte contamination fécale en raison de la densité de ces populations d'élevage ou grégaires dans certaines portions du territoire du bassin versant de la rivière l'Assomption (BVRA) et/ou du bassin versant de la rivière South Nation (BVRSN). Aussi, le génome mitochondrial de chacune de ces espèces était complètement séquencé et disponible pour effectuer la conception des amorces consensuelles et spécifiques. Il aurait été intéressant d'inclure des animaux domestiques tels que le chien et le chat dans notre projet de

recherche puisqu'une étude similaire à la nôtre a observé qu'en plus de l'ADNmt humain, celui du chien était aussi détecté dans les eaux usées domestiques (Caldwell et Levine 2009). Ainsi, le dépistage des marqueurs mitochondriaux du chien aurait pu appuyer l'hypothèse selon laquelle les eaux de surface contenant de l'ADNmt humain étaient contaminées par des effluents domestiques. Une autre étude a développé un marqueur Bacteroidales spécifique au chien et l'a détecté dans des eaux usées municipales mais avait alors attribué ce résultat à de la réactivité croisée (Kildare *et al.* 2007). La présence de marqueurs mitochondriaux canins est probablement attribuable au fait que les propriétaires de chiens représentent une importante proportion de la population urbaine et qu'ils ont majoritairement l'habitude de vidanger les déchets fécaux de leurs animaux de compagnie dans les toilettes. Pour ce qui est des chats domestiques, on peut supposer que cette pratique est moins courante en raison du colmatage des conduits par le sable de litière. Il aurait aussi été intéressant de dépister les marqueurs mitochondriaux d'animaux semi-aquatiques pouvant causer une contamination fécale de l'eau de surface comme le castor, le rat musqué et le canard.

4.1.2 Choix des sources d'ADN matrice

Différentes sources d'ADN ont été utilisées dans le cadre de ce projet. Les produits d'extraction d'ADN provenant de tissus animaux ou d'eaux usées ont servi à valider les amorces et la méthodologie de détection alors que les eaux de surface furent utilisées pour appliquer la méthode à grande échelle. Lorsqu'on constate que plusieurs chercheurs utilisent de l'ADN provenant de poils ou de fèces (Parson *et al.* 2000; Caldwell *et al.* 2007; Baker-Austin *et al.* 2009), il est pertinent d'expliquer pourquoi nous avons plutôt choisi de valider les amorces avec de l'ADN extrait de tissus animaux.

Il faut rappeler que les étapes de validation visaient principalement à confirmer que les amorces spécifiques amplifiaient efficacement l'ADN de l'espèce visée et n'induisaient aucune amplification de l'ADN appartenant à d'autres espèces. Il fallait donc s'assurer de travailler avec de l'ADN pur provenant d'un seul individu et ne contenant pas d'inhibiteurs enzymatiques. L'utilisation d'ADN non ciblé contaminé par de l'ADN ciblé aurait pu induire de faux résultats positifs, suggérant une non-spécificité

de l'amplification et menant au rejet des amorces conçues. Aussi, la contamination de l'ADN par des inhibiteurs de PCR aurait risqué d'induire de faux résultats négatifs, menant au rejet d'amorces pourtant fonctionnelles ou encore à la sélection d'amorces non-spécifiques.

En regard de ces critères, l'ADN extrait de poils ou de fèces contenait trop d'impuretés. En effet, des collaborateurs de l'IRB-CNRC ont obtenu des quantités satisfaisantes d'ADN canin et félin par des méthodes non invasives (prélèvement de poils ou de cellules épithéliales buccales) mais leurs produits d'extraction étaient généralement contaminés par de l'ADN humain. Pour y remédier, nous avons tenté d'obtenir de l'ADN à partir de poils félins ou canins en ajoutant une étape de décontamination à notre protocole d'extraction (Jehaes *et al.* 1998). Cette approche a toutefois entraîné trop de pertes et n'a pas été en mesure de fournir une concentration en acides nucléiques détectable par spectrophotométrie ou par électrophorèse sur gel d'agarose (résultats non présentés). Les mêmes collaborateurs ont aussi été en mesure d'extraire l'ADN de fèces provenant de différentes espèces animales. Il est reconnu que l'amplification d'ADN provenant d'échantillons fécaux peut être inhibée par l'excès d'ADN non spécifique dérivé des microorganismes et par la présence de substances comme l'hémoglobine, la bilirubine, les sels biliaries, l'urée et l'héparine (Marsh *et al.* 2000; Maibach *et al.* 2002). De plus, il semble que les produits d'extraction obtenus à partir de matières fécales pourraient aussi contenir des traces d'ADN étranger d'origine alimentaire. En 2005, cette hypothèse avait été rejetée par notre laboratoire suite à l'obtention de résultats négatifs de dépistage d'ADNmt de mouton, de porc ou de bœuf dans les fèces d'un humain ayant consommé la viande de ces espèces animales le jour précédent (Martellini *et al.* 2005). En 2009, une autre équipe de recherche a répété l'expérience en analysant les fèces de seize volontaires humains ayant consommé du porc ou du bœuf dans les 48 heures précédant l'échantillonnage (Caldwell *et al.* 2007). Encore une fois, aucun ADNmt porcin n'a été détecté. Toutefois, une quantité significative d'ADNmt de bœuf a été décelée dans les fèces de deux des quatre sujets ayant consommé du bœuf. Précisons néanmoins que la quantification de cet ADNmt étranger était 1 à 2 ordres de magnitude inférieure à celle de l'ADNmt humain (Caldwell *et al.* 2007). Ces résultats démontrent que les fèces sont susceptibles de contenir de l'ADNmt provenant d'une autre espèce animale que l'hôte, ce qui en fait une source d'ADN inappropriée dans le cadre de la validation des

amorces. Les tissus animaux se sont donc avérés être la meilleure source d'ADN matrice en raison de leurs produits d'extraction hautement concentrés et apparemment exempt d'inhibiteurs d'amplification PCR (Tableau 3.1, Figure 3.1 et Figure 3.3).

Dans le cadre de la validation de la méthodologie de détection, l'ADN extrait des eaux usées non traitées de la station d'épuration de Rosemère-Lorraine a été sélectionné comme contrôle positif de contamination fécale (Section 3.1.3). Cette station était située dans le bassin versant de la rivière des Mille Îles où diverses formes et sources de contamination ont été constatées. En plus des activités agricoles qui occupaient une superficie importante dans les principaux tributaires, la presque totalité des industries déversaient leurs eaux de procédé, prétraitées ou non, dans les réseaux d'égouts municipaux (Brouillette 2007). Le milieu urbain contribuait aussi grandement à l'apport en eaux usées puisque cette station d'épuration recevait les effluents d'une population estimée à 27 000 personnes en 2006 (Brouillette 2007). Concrètement, il s'agissait d'un excellent contrôle positif puisque l'analyse de ces eaux d'égout en 2001 et 2002 a résulté en un dénombrement des coliformes thermotolérants et de *E. coli* de l'ordre du 2 000 000 UFC / 100 ml, ce qui reflétait un important niveau de contamination fécale (Payment *et al.* 2003).

4.1.3 Choix de la stratégie d'amplification PCR

Dans la littérature, les travaux portant sur la détection de l'ADNmt dans l'eau ont généralement fait appel à diverses méthodologies d'amplification, que ce soit par PCR multiplex (Martellini *et al.* 2005), par qPCR multiplex (Caldwell *et al.* 2007), par qPCR simple (Schill et Mathes 2008; Caldwell et Levine 2009; Baker-Austin *et al.*), par nPCR (Martellini *et al.* 2005; Kortbaoui *et al.* 2009) ou encore par amplification PCR consensuelle combinée à une hybridation spécifique sur membrane (Kortbaoui *et al.* 2009). Plus précisément, l'amplification par PCR multiplex consiste à utiliser simultanément plusieurs paires d'amorces spécifiques dans une même réaction, ce qui représente une économie de temps et d'argent. Toutefois, plusieurs problèmes y ont été associés tels que le manque de spécificité, la faible sensibilité, l'amplification préférentielle de certaines cibles et la formation de dimères d'amorces (Martellini *et al.* 2005). Il en va de même pour l'amplification qPCR multiplex en temps réel avec laquelle les

résultats détectent habituellement un marqueur spécifique dominant dont le signal masque les autres (Caldwell *et al.* 2007). De plus, même en rejetant l'approche multiplex, l'amplification qPCR a le désavantage de nécessiter des réactifs dispendieux et des techniciens plus qualifiés.

Dans le cadre de travaux effectués précédemment par le groupe de recherche du Pr. Richard Villemur, la stratégie a consisté à concevoir pour chaque espèce ciblée une première paire d'amorces spécifiques générant un amplicon au sein duquel une deuxième paire d'amorces spécifiques était conçue (Martellini *et al.* 2005; Kortbaoui *et al.* 2009). En d'autres termes, cette technique appelée PCR nichée consistait à réaliser deux amplifications PCR successives en utilisant des couples d'amorces différents, le deuxième couple d'amorces encadrant une séquence incluse dans celle qui était amplifiée par le premier couple d'amorces. En voulant poursuivre cette approche, il a été réalisé que l'augmentation du nombre d'espèces animales à détecter entraînait une multiplication de la quantité de réactions d'amplification nécessaires et que cela nécessitait une proportion de plus en plus importante de l'ADN matrice extrait de chaque échantillon d'eau. Ce dernier élément étant limitant, il imposait un nombre maximal de réplicats et/ou d'espèces ciblées.

Souvent, lorsque les quantités d'ADN matrice sont limitées, les chercheurs procèdent à l'amplification complète du génome (whole-genome amplification) en répliquant tout l'ADN d'un échantillon de façon égale et indépendamment de la séquence à l'aide d'amorces aléatoires ou dégénérées (Cheung et Nelson 1996; Shendure *et al.* 2004). En s'inspirant de cette approche, il a été proposé ici de concevoir toutes les paires d'amorces spécifiques nichées au sein d'une séquence amplifiée par des amorces consensuelles. Autrement dit, la stratégie préconisée consistait à n'utiliser l'ADN matrice qu'une seule fois pour amplifier l'ADNmt de toutes les espèces présentes dans l'échantillon à l'aide d'amorces consensuelle. Les amplicons générés ont ensuite pu être utilisés comme ADN matrice pour les différentes amplifications nPCR en temps réel à l'aide de paires d'amorces spécifiques aux espèces animales ciblées par la détection. Les protocoles d'amplification nPCR sont généralement préconisés en raison de leur haute sensibilité mais ne sont pas quantitatifs et sont sujets à de la contamination croisée en laboratoire (Hundesha *et al.* 2009). Dans notre méthodologie, certains éléments du travail en temps réel avec SYBR Green ont été adoptés de façon à assurer une sensibilité de détection et une rapidité

d'exécution satisfaisantes. De plus, le fait que la lecture de fluorescence ne nécessitait pas l'ouverture des tubes contenant les produits d'amplification pour les analyser permettait de réduire considérablement les risques de contamination par recirculation d'amplicons.

4.1.4 Critères de conception des amorces spécifiques

Le logiciel AlleleID 6.0 était programmé pour évaluer des amorces conçues pour l'amplification nPCR en temps réel en présence de SYBR Green. Les principales conditions à respecter concernaient la température de dénaturation (T_m) et la tendance à former des structures secondaires (Tableau 2.VI). Une difficulté supplémentaire a été amenée par le fait que la conception était restreinte à la séquence de l'amplicon consensuel et à la localisation des polymorphismes spécifiques.

Le logiciel AlleleID 6.0 jugeait satisfaisant un amplicon d'une longueur de 75 à 200 pb. Ces tailles sont généralement suggérées puisque les amplicons courts sont typiquement amplifiés avec une efficacité plus élevée. Ce paramètre a néanmoins été modifié à la hausse suite à des recommandations demandant de concevoir des amorces générant des amplicons d'une taille supérieure à 200 pb. Cette dérogation aux règles habituelles de l'amplification qPCR ne semble pas avoir eu d'impact significatif, d'autant plus que la méthode mise au point n'était pas quantitative. Lors de la conception, nous avons aussi préconisé des amorces dont le taux de bases guanine et cytosine équivalait à environ 50% pour favoriser la stabilité du complexe formé par l'amorce et la matrice d'ADN lors de l'élongation. Malgré le fait que les génomes mitochondriaux ont généralement un faible coefficient de Chargaff, ce critère a été respecté pour la plupart des paires d'amorces conçues. Finalement, dans tous les cas, la différence de T_m entre les deux amorces de chaque paire n'excédait pas 3,4 °C, ce qui favorisait l'obtention de propriétés d'hybridation similaires.

L'absence de structures secondaires formées par les amorces était un paramètre très important dans la mesure où ces appariements double brin peuvent entraîner une fluorescence non spécifique du SYBR Green. Néanmoins, il s'est avéré que presque toutes les amorces conçues étaient susceptibles de former une ou plusieurs structures secondaires dont l'énergie libre de Gibbs (ΔG) excédait le maximum acceptable (Tableau

2.vi). Puisqu'une telle latitude a été permise pour ce critère lors de la conception *in silico*, les amorces et les conditions d'amplification ont ensuite été rigoureusement validées et optimisées en laboratoire.

4.2 Validation des amorces

4.2.1 Universalité des amorces consensuelles

La paire d'amorces consensuelles MI50 a été conçue par la collaboratrice Minh Vuong (IRB-CNRC, laboratoire de Luke Masson) à partir de séquences hautement conservées au sein de l'alignement des génomes mitochondriaux de plus d'une cinquantaine d'espèces animales.

Au moment de l'achèvement de ce projet, la base de données du NCBI incluait des séquences complètes de génomes mitochondriaux pour au moins 311 mammifères (classe des Mammalia) et 116 oiseaux (classe des Aves), incluant les espèces animales ciblées par le présent projet (Figure 1.3). Le programme BLAST a été utilisé pour identifier les espèces animales dont le génome mitochondrial est complémentaire à la séquence des amorces consensuelles (Tableau 2.III). En considérant que les 120 organismes reconnus par l'amorce MI50-R font partie des 173 organismes reconnus par l'amorce MI50-F, il est probable que la paire d'amorces consensuelles puisse amplifier l'ADNmt d'au moins 120 différentes espèces de vertébrés, incluant des mammifères, des oiseaux, des reptiles et des amphibiens. Parmi ces séquences, une cinquantaine ont été sélectionnées et alignées, correspondant principalement à des animaux retrouvés sur le territoire canadien (Tableau 2.IV). L'analyse a permis de valider *in silico* que la séquence ciblée par les amorces consensuelles était conservée chez toutes les espèces de cet alignement sauf le hérisson (3 SNPs), le lièvre (1 SNP), le chat (1 SNP) et le faisan du Sri Lanka (1 SNP) (résultats non montrés). Notons néanmoins que Minh Vuong a été en mesure d'amplifier efficacement de l'ADN de chat avec les amorces consensuelles (communications personnelles). En assumant que la séquence disponible du génome mitochondrial du chat est exacte, on pourrait supposer que la substitution d'un seul nucléotide ne compromet pas nécessairement l'obtention d'amplicons consensuels à cette étape de la détection.

En laboratoire, les amorces consensuelles ont été en mesure de générer les produits d'amplification attendus à partir de l'ADN des 14 espèces sélectionnées pour ce projet (Figure 3.3). Toutefois, même si la quantité d'ADN matrice était similaire pour toutes les réactions, les rendements d'amplification PCR ont différé d'une espèce à l'autre. Cela s'explique par le fait que la quantification d'ADN total tenait compte de l'ensemble des acides nucléiques du génome nucléaire et du génome mitochondrial. Étant donné les variations du nombre de copies du génome mitochondrial par mitochondrie et du nombre de mitochondries par cellule, les produits d'extraction d'ADN total des différents tissus animaux comprenaient différentes proportions du génome mitochondrial par rapport au génome nucléaire. Les espèces animales pour lesquelles l'amplification a généré le plus d'amplicons consensus étaient probablement celles dont l'ADN matrice contenait une plus grande part d'ADNmt. En constatant que la concentration d'ADNmt par cellule influençait le rendement de l'amplification, il est pertinent de se demander si la détection spécifique s'en trouvait biaisée ? Autrement dit, est-ce que notre méthode de détection des sources de contamination fécale en eaux de surface a favorisé l'identification des espèces animales dont les cellules de l'épithélium intestinal comportaient un plus grand nombre de copies du génome mitochondrial ? Quoiqu'il n'y ait que peu de connaissances à ce propos, il semble que le nombre de copies et la durée de la demi-vie de l'ADNmt varient selon le type de tissus (Clay Montier *et al.* 2009). Aussi, l'importance de l'exfoliation et la quantité d'ADN de l'hôte retrouvé dans les fèces diffèrent d'une espèce à l'autre. Par exemple, chez le rat, une quantité considérable de colonocytes sénescents sont relâchés dans le lumen intestinal et les fèces alors que chez l'humain ceux-ci sont majoritairement phagocytés par les macrophages des muqueuses intestinales (Van Lieshout *et al.* 2004). De plus, les concentrations d'ADNmt mesurées dans les fèces d'humain et de bœuf diffèrent de 1 à 3 ordres de magnitude avec des valeurs respectives de 0,28 - 27 et 16,9 - 106 millions de copies par gramme (Caldwell *et al.* 2007; Schill et Mathes 2008). Des études plus approfondies seraient nécessaires pour être en mesure d'évaluer concrètement l'impact qu'ont ces variations sur les résultats de détection spécifique des sources de contamination fécale dans les eaux de surface.

En amplifiant de l'ADN total animal avec les amorces consensuelles, certains amplicons de tailles non spécifiques ont été observés, notamment dans les produits

d'amplification du mouton et du goéland (Figure 3.3). Sachant que l'ADN matrice avait été extrait de tissus purs, ces amplicons supplémentaires pourraient être attribuables à l'amplification de pseudogènes. Un pseudogène est une copie reconnaissable d'un gène ayant perdu sa fonction ou plus précisément d'une copie d'ADNmt s'étant intégrée au génome nucléaire (Bensasson *et al.* 2001). Chez l'humain, il semble qu'au moins une copie de chaque région du génome mitochondrial humain réside sous forme de pseudogène dans le génome nucléaire (Andreasson *et al.* 2006). Ceux-ci peuvent avoir différentes tailles, provenir de tous types de séquence et comporter différents degrés de similarité avec leurs équivalents mitochondriaux (Bensasson *et al.* 2001). Est-ce que l'amplification de ces pseudogènes par les amorces consensuelles est problématique dans le cadre de nos analyses ? Probablement pas puisque le but principal de l'amplification consensuelle était d'augmenter la sensibilité de l'essai mais pas nécessairement d'en assurer la spécificité. Aussi, il s'est avéré que la baisse de rendement engendrée par ces amplifications non spécifiques était minime (Section 4.4). Rappelons que la présente méthodologie n'avait pas de portée quantitative absolue et que même dans cette éventualité l'impact ne serait pas significatif. Par exemple, en assumant que chaque cellule contient 1000 copies d'ADNmt et que la séquence ciblée pour la quantification ait une complète homologie avec un pseudogène, la variation de sa quantification serait négligeable, soit 1002 plutôt que 1000 copies d'ADNmt par cellules (Andreasson *et al.* 2006).

4.2.2 Spécificité des amorces spécifiques

Chaque amorce spécifique a été conçue pour s'hybrider à une séquence retrouvée dans l'amplicon consensuel d'une seule espèce ou d'un seul genre. Même si les animaux d'élevage sont souvent issus de mêmes lignées bien conservées de géniteurs, pour s'assurer de ne pas concevoir l'amorce au niveau d'une séquence hypervariable, des alignements ont été préparés avec les résultats de séquençage de différents individus d'une même espèce (Tableau 2.IV, séquences ciblées). La conception était aussi majoritairement basée sur l'alignement des génomes mitochondriaux ayant servi à la validation *in silico* des amorces consensuelles (Tableau 2.IV, séquences à exclure). Toutefois, une recherche d'informations a permis d'apprendre que quelques espèces incluses dans cet alignement

n'étaient pas présentes au Canada. Par exemple, certaines espèces de faisans étaient endémiques à d'autres régions du monde seulement (Fumihito *et al.* 1996). Aussi, le goéland dominicain était absent de l'Amérique du nord (IUCN 2010). Finalement, la caille de Chine ne constituait pas une espèce d'élevage puisqu'elle n'avait pas été domestiquée (Nishibori *et al.* 2002). Les génomes mitochondriaux de ces espèces n'ont donc pas été considérés lors de la conception des amorces spécifiques.

Le programme BLAST a été utilisé pour identifier les espèces animales dont le génome mitochondrial était complémentaire à la séquence de chacune des amorces spécifiques (Tableau 2.V). Dans tout les cas, au moins une occurrence correspondait à l'espèce visée lors de la conception. Parfois, les amorces étaient aussi complémentaires à l'ADN d'une ou plusieurs espèces du même genre ou de la même famille. Par exemple, les amorces visant les goélands pourraient aussi amplifier l'ADNmt des mouettes de la famille des Laridae, ce qui élargirait le spectre d'oiseaux côtiers dont on peut détecter la contamination fécale. Mentionnons aussi l'amorce HUmito5-G qui a été conçue spécifiquement pour cibler l'humain (*Homo Sapiens*) mais qui correspondait également à un autre organisme de la famille des Hominidae, le gorille occidental (*Gorilla gorilla*). Cela n'a toutefois pas eu d'impact sur la présente étude puisqu'au Canada on ne retrouvait que quelques individus dans les zoos et qu'il s'agissait d'une espèce en danger critique d'extinction (IUCN 2010).

En laboratoire, toutes les paires d'amorces spécifiques ont été en mesure de générer les produits d'amplification attendus à partir des amplicons consensus correspondant à l'espèce ciblée (Figure 3.4 et Figure 3.5). Aucune amplification croisée ou non-spécifique n'a été observée. La possibilité de formation de dimères d'amorces a été vérifiée expérimentalement en étudiant la courbe de dénaturation du contrôle négatif (sans ADN matrice) des produits d'amplification nPCR (Figure 3.6). Seulement trois paires d'amorces ont présenté un pic de dénaturation non spécifique, soit CKmito5 (coq), CAMito5 (caille) et GOMito6 (goéland). En théorie, la fluorescence non spécifique des dimères d'amorces est susceptible de générer de faux résultats positifs. En effet, lorsqu'il n'y a pas d'ADN matrice pour monopoliser les amorces, il y a une plus forte probabilité que celles-ci interagissent et forment des dimères dont la structure double brin recrutera le SYBR Green et intensifiera sa fluorescence. Un faux signal positif est ainsi créé sans

qu'aucun amplicon n'ait été généré. N'ayant pas été en mesure de concevoir de meilleures amorces spécifiques au coq, à la caille ou au goéland, il a plutôt été décidé de palier au problème en réajustant les conditions réactionnelles de l'amplification.

4.3 Optimisation des conditions d'amplification PCR et nPCR

4.3.1 Conditions d'amplification PCR par les amorces consensuelles

L'amplification PCR de l'ADNmt animal par la paire d'amorces consensuelles MI50 avait pour but d'augmenter le nombre de copies des marqueurs mitochondriaux présents dans l'échantillon. Il s'agissait donc d'une étape où la sensibilité était primordiale. La concentration des amorces ainsi que les températures de dénaturation des doubles brins d'ADN et d'élongation des amplicons ont été choisies selon les recommandations du fabricant de l'ADN polymérase. En effet, ces températures dépendent respectivement de la stabilité de l'enzyme et de la température optimale de son activité catalytique. La cinétique de liaison entre les amorces et l'ADN matrice complémentaire varie dépendamment de la température d'appariement (T_a) (Ishii et Fukui 2001). Il a été suggéré qu'une amplification PCR consensuelle effectuée à basse T_a permet d'amplifier l'ADN d'une plus grande variété d'organismes (Ishii et Fukui 2001). Toutefois, il était recommandé de ne pas utiliser une T_a inférieure à 60°C puisque l'ADN polymérase Phusion™ Hot Start est liée de façon réversible à une protéine spécifique Affibody® qui inhibe son activité à température ambiante. La T_a de 60°C a ainsi été sélectionnée de façon à favoriser l'hybridation entre les amorces consensuelles et l'ADN matrice tout en évitant l'inhibition thermique de l'enzyme au cours de l'amplification PCR.

4.3.2 Conditions d'amplification nPCR par les amorces spécifiques

L'amplification d'un segment des amplicons consensuels par les paires d'amorces spécifiques avait pour but de déterminer de quelle(s) espèce(s) animale(s) provenaient les marqueurs mitochondriaux présents initialement dans l'échantillon d'eau. Il s'agissait donc d'une étape où la spécificité était primordiale. Le fabricant du mélange réactionnel PerfeCTa SYBR™ Green FastMix™ recommandait d'utiliser chaque amorce à une

concentration de 0,1-0,5 μM . Il a été observé que la concentration maximale de 0,5 μM augmentait généralement l'efficacité de l'amplification mais favorisait aussi la formation de dimères chez certaines amorces comme la paire GOmito6 (Figure 3.11). La formation de dimères nécessite généralement la conception de nouvelles amorces puisque la fluorescence non-spécifique de ces courts duplexes biaise le signal tel qu'expliqué précédemment. Il a plutôt été décidé d'y remédier en diminuant la concentration d'amorces à 0,2 μM . Cette stratégie visait à limiter la présence d'homodimères et de structures en épingle à cheveux dans le mélange réactionnel ainsi qu'à limiter la probabilité de formation d'hétérodimères. Il est important de préciser que la baisse de sensibilité causée par une diminution de la concentration en amorces n'a pas eu d'influence ici puisque l'étape de l'amplification PCR consensuelle avait préalablement amplifié les marqueurs mitochondriaux présents dans l'échantillon d'ADN initial. Aussi, la baisse d'efficacité d'amplification était significative mais pas réellement problématique puisque l'analyse n'était pas effectuée dans un but quantitatif.

La température d'appariement (T_a) est souvent calculée en ajoutant 3 °C à la valeur de la température de dénaturation théorique (T_m). Or, malgré le fait que les différentes amorces spécifiques correspondaient à différentes T_m théoriques (résultats non présentés), il a été préconisé d'utiliser la même T_a pour l'ensemble des amplifications nPCR spécifiques. L'optimisation en laboratoire a mené au choix d'une T_a de 55 °C (Figure 3.9). En observant par électrophorèse sur gel d'agarose l'intensité des bandes d'amplicons obtenus avec cette T_a , il est évident que celle-ci n'était pas optimale pour la paire d'amorces CBmito5 mais elle a permis néanmoins d'obtenir un rendement d'amplification satisfaisant.

4.4 Inhibition par l'ADN matrice non-spécifique

En plus de contenir l'ADNmt des espèces animales étant à la source de la contamination fécale, les échantillons d'eau de surface sont susceptibles de comporter de l'ADN provenant d'organismes comme les bactéries, les algues et les multiples autres eucaryotes qui vivent et meurent dans l'eau. Sachant que les amorces consensuelles ont été conçues pour reconnaître une séquence hautement conservée, il était pertinent

d'envisager qu'elles soient en mesure de s'hybrider à l'ADN de ces différents organismes présents dans l'eau. Par exemple, cette séquence est conservée dans le génome mitochondrial de plusieurs espèces de poissons d'eau douce (Tableau 2.II).

Schill et Mathes (2008) ont déterminé que l'ajout de plus de 1 250 ng d'ADN non-spécifique au mélange réactionnel était nécessaire pour observer un effet inhibiteur sur la détection des marqueurs mitochondriaux par des amorces spécifiques. Qu'en est-il dans le cas d'une méthodologie qui utilise des amorces consensuelles? Pour déterminer si la monopolisation des amorces consensuelles par de l'ADNmt non ciblé pouvait diminuer la sensibilité globale de notre méthode, la détection du cerf rouge a été effectuée en analysant des produits d'extraction d'ADN de cerf rouge et de coq combinés dans différentes proportions (Figure 3.14). Pour observer une diminution significative du signal de détection spécifique du cerf, il fallut inclure au moins 100 000 fois plus d'ADN non ciblé (10 ng d'ADN total de coq) que d'ADN ciblé (0,1 pg d'ADN total de cerf). Cela suggère que lors de l'amplification consensuelle, la compétition entre l'ADNmt spécifique et l'ADNmt non-spécifique pour s'hybrider aux amorces consensuelles a diminué le rendement de détection. Pourrait-il y avoir inhibition complète de la détection? Cette éventualité nécessiterait que les 25 pmol d'amorces du mélange réactionnel s'hybrident à 25 pmol d'ADNmt non-spécifique, ce qui équivaut par exemple à environ 270 µg d'ADNmt humain⁴. Cette quantité dépasse largement celle de l'ADN matrice utilisé dans nos amplifications consensuelles. Puisque notre méthodologie n'est pas quantitative et que l'inhibition complète est peu probable, ce phénomène n'a pas été considéré comme étant problématique. Aussi, ces essais ont démontré qu'avec notre méthode, contrairement à l'approche multiplex, l'abondance du marqueur mitochondrial d'une espèce dominante ne masquait pas la détection des autres espèces ayant pu contribuer à la contamination fécale dans une plus faible proportion.

⁴ Calculé en considérant une taille de 16 569 pb, un poids moléculaire moyen de 650 Da/pb et un nombre de molécules de 25×10^{-12} mol.

(http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/general_data/nucleic_acid_data.asp)

4.5 Amplification sur plateforme robotique

L'équipement et les réactifs auxquels ont accès les laboratoires de recherche évoluent sans cesse et permettent aux scientifiques de repousser continuellement les limites de nos connaissances. Toutefois, cette technologie de pointe implique d'importants investissements en matériel et en expertise. Le temps et le coût d'exécution sont d'ailleurs les principaux obstacles au transfert technologique des laboratoires de recherche vers les laboratoires d'analyse. En ayant cette problématique à l'esprit, nous avons proposé une méthodologie alternative utilisant des réactifs plus abordables et pouvant être robotisée.

Dans le cadre de la détection de plusieurs espèces animales différentes par notre méthodologie initiale, le réactif le plus dispendieux était le mélange réactionnel commercial contenant du SYBR Green I utilisé pour les amplifications spécifiques. En plus de se retrouver dans les mélanges commerciaux de qPCR, le SYBR Green I est une molécule fluorescente couramment utilisée comme colorant faiblement mutagène pour les gels d'électrophorèse. L'augmentation de l'intensité de sa fluorescence serait due à la restriction du mouvement interne du SYBR Green résultant de son interaction avec l'ADN (Trantakis *et al.* 2010). Ce mécanisme de liaison impliquerait à la fois son intercalation dans le duplexe d'ADN et son attachement à la surface du petit sillon de la double hélice (Trantakis *et al.* 2010). Puisque le SYBR Green I a un coût abordable lorsque vendu sous sa forme concentrée, des essais ont été tentés pour développer un mélange réactionnel « maison » équivalent à celui du commerce comme cela a souvent été rapporté dans la littérature (Fruman *et al.* 2002; Karsai *et al.* 2002; Selvapandiyani *et al.* 2005; Pellissier *et al.* 2006; Wolffs *et al.* 2006; Pizzato *et al.* 2009). Toutefois, la qualité de détection de notre mélange était considérablement inférieure à celle du mélange réactionnel commercial (résultats non montrés). La principale difficulté était d'utiliser une concentration de SYBR Green permettant de générer une fluorescence satisfaisante tout en n'inhibant pas la réaction de polymérisation. Cette inhibition aurait pu être partiellement renversée en augmentant la concentration réactionnelle de magnésium mais une telle modification diminuait significativement la spécificité d'amplification (Nath *et al.* 2000). Notons que nous n'avons pas effectué d'essais supplémentaires avec les autres molécules fluorescentes spécifiques à l'ADN disponibles

sur le marché telles l'Hoechst, le PicoGreen ou encore les diverses formes de SYTO (Gudnason *et al.* 2007).

Il y a plus de dix ans, des chercheurs ont développé l'idée de mesurer quantitativement la concentration d'ADN dans les puits d'une microplaque en mesurant la fluorescence du SYBR Green I par le système d'imagerie d'un transilluminateur-UV standard (Vitzthum *et al.* 1999) ou par un lecteur de fluorescence en microplaque (Leggate *et al.* 2006). Cette approche a ensuite été appliquée à la détection des produits d'amplifications PCR avec un lecteur conventionnel de fluorescence en microplaque (Yamaguchi *et al.* 2002a; Yamaguchi *et al.* 2002b). Notre méthodologie alternative était fortement inspirée de cette stratégie qui consistait à ajouter le SYBR Green I entre l'amplification et la lecture. Les principales modifications apportées ici étaient liées à l'adaptation à une plate forme robotique. Par exemple, l'utilisation de plaques de polypropylène opaques dont les puits étaient scellés par un liquide hydrophobe incolore avait pour but de procéder à l'amplification nPCR, à l'ajout du SYBR Green, à l'incubation avec agitation puis à la lecture de fluorescence de façon entièrement robotisée et sans l'intervention d'un technicien. Quoiqu'il n'ait pas été possible de faire une preuve de concept en bonne et due forme, cette méthodologie s'est avérée efficace pour détecter spécifiquement l'ADNmt présent dans des eaux usées (Section 3.4). Les seuls problèmes rencontrés n'étaient pas dus à la technique elle-même mais plutôt à trois de nos paires amorces spécifiques dont la tendance à former des dimères stables biaisait les résultats (Figure 3.16).

Même si la méthodologie alternative de détection du produit d'amplification final par lecture de fluorescence n'a pas été sélectionnée pour effectuer l'analyse des eaux de surface étudiées dans ce projet, elle s'est avérée prometteuse dans l'éventualité de criblages à grande échelle et à haut débit.

4.6 Les eaux de surface du BVRA et du BVRSN

Des eaux de surface ont été échantillonnées dans deux bassins versants ayant un historique de contamination fécale récurrente et dont le territoire inclut à la fois des zones urbaines, agricoles et boisées. Le bassin versant de la rivière l'Assomption est situé au Québec et il a été échantillonné par l'équipe du laboratoire de Richard Villemur alors que

le bassin versant de la rivière South Nation est situé en Ontario et il a été échantillonné par des chercheurs d'Agriculture et Agroalimentaire Canada. Dans les deux cas, une analyse microbiologique a permis d'évaluer le degré de contamination fécale en se basant sur le décompte des coliformes thermotolérants. Aussi, l'ADN a été extrait du rétentat de filtration de chaque échantillon pour y détecter spécifiquement les marqueurs mitochondriaux ciblés par la méthode mise au point dans le cadre de ce projet.

4.6.1 Récolte et préparation des échantillons d'eau de surface

La stratégie d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption consistait à prélever un seul volume d'eau par station pour les analyses biomoléculaires. À partir de ce simplicata, deux ou trois filtrations étaient ensuite effectuées. Il est important de clarifier que les rétentats obtenus étaient des « répliquats de filtration » et non des répliquats biologiques. Aussi, chaque station a été échantillonnée deux années subséquentes mais à des saisons distinctes, soit au printemps 2008 (juin) et à l'automne 2009 (octobre). Dans la rivière l'Assomption et ses tributaires, une étude de Payment *et al.* portant sur un autre type d'indicateurs, les virus entériques humains et animaux, a déjà rapporté un schéma saisonnier dans les concentrations virales mesurées (Payment *et al.* 1988). Notre fréquence d'échantillonnage ne permettait évidemment pas d'évaluer la variation du dépistage des marqueurs mitochondriaux dans le temps. Néanmoins, le choix de ces périodes était judicieux puisqu'elles coïncidaient avec le début et la fin des périodes massives d'épandage de fumier sur les terres agricoles. En effet, en 2007 dans la région de Lanaudière, les volumes d'engrais de ferme ont été épandus à 47 % avant les semis, à 6 % entre les semis et la récolte et à 46 % après la récolte (Drolet et Pigeon 2008).

Étant donné la disproportion entre la taille du territoire à l'étude et les moyens financiers du projet, nous avons adopté une stratégie d'échantillonnage à choix raisonné. Cela signifie que l'emplacement des stations d'échantillonnage a été déterminé en fonction de caractéristiques correspondant à la structure et au fonctionnement du système étudié (Scherrer 1984), telles que la position des émissaires municipaux, des ponts et des populations humaines et animales avoisinantes. Quoique cette approche soit moins valide et représentative qu'un échantillonnage aléatoire, elle permet de poser un premier

diagnostic sur l'état d'un système dont les grands principes de fonctionnement sont connus (Scherrer 1984). Idéalement, dans le cadre de futures études de dépistage des marqueurs mitochondriaux dans les eaux de surface, il serait intéressant d'avoir les moyens d'appliquer une approche expérimentale comportant un échantillonnage aléatoire, un plus grand effectif, une plus grande fréquence, plusieurs réplicats ainsi qu'une meilleure connaissance du territoire et des intrants potentiels de contamination fécale.

La variabilité des périodes et de la fréquence d'échantillonnage des différentes stations du bassin versant de la rivière South Nation complexifie l'analyse des résultats de dépistage de l'ADNmt d'un point de vue spatial. En effet, pour évaluer la continuité de la détection des marqueurs mitochondriaux de l'amont vers l'aval il aurait été intéressant que les prélèvements soient effectués dans les mêmes intervalles de temps.

Au cours de la deuxième campagne d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption, il a été remarqué que des sédiments pouvaient s'accumuler dans l'échantillonneur. Nous avons alors émis l'hypothèse que ces particules pourraient contenir des marqueurs de contamination fécale (cellules épithéliales de l'hôte et/ou coliformes thermotolérants) et biaiser les prélèvements subséquents par contamination croisée. Pour vérifier cette supposition, à la fin de chaque journée d'échantillonnage, un échantillon supplémentaire était prélevé dans un récipient remplis d'eau potable (du robinet). L'analyse de ces témoins négatifs a permis d'y détecter des marqueurs mitochondriaux humains (résultats non montrés). Dans un premier temps, quoiqu'il n'ait pas été possible d'établir avec certitude si ces marqueurs avaient été véhiculés par l'échantillonneur ou encore par le manipulateur, nous avons conclu qu'à l'avenir il serait préférable de rincer l'échantillonneur entre les prélèvements d'eau de surface. Dans un deuxième temps, notre équipe de recherche a été en mesure de détecter la présence d'ADN mitochondrial humain dans l'eau potable mais pas dans l'eau ultrapure. Cela suppose que l'eau de rinçage de l'échantillonneur constituait également une source potentielle de contamination croisée par de l'ADNmt humain.

4.6.2 Extraction et purification de l'ADN

Les protocoles d'extraction de l'ADN sont souvent inadéquats en raison d'une lyse incomplète des cellules, de l'attachement non spécifique des acides nucléiques aux surfaces et de la co-extraction d'acides humiques qui inhibent les réactions enzymatiques et l'hybridation nécessaires à l'amplification PCR (Mumy et Findlay 2004). Au début du présent projet, des essais ont été menés pour comparer différentes méthodologies d'extraction d'ADN des rétentats de filtration (résultats non montrés). Il a été constaté que la méthode d'extraction au phénol et au chloroforme couramment utilisée dans le laboratoire du Pr. Richard Villemur permettait d'obtenir une excellente pureté mais était trop variable et laborieuse pour éventuellement être appliquée à l'analyse d'échantillons à grande échelle et à haut débit. À l'inverse, l'ensemble d'extraction d'ADN commercial précédemment adopté par Randa Kortbaoui fonctionnait selon le principe d'affinité entre la silice et l'ADN, ce qui avait l'avantage de permettre une grande rapidité et facilité d'exécution tout en pouvant éventuellement être robotisé. Cette méthodologie a donc été conservée pour le présent projet malgré l'impureté des produits d'extraction qui était constatée par de faibles ratios d'absorbance A_{230}/A_{260} et A_{280}/A_{260} (Section 3.5.1) (Bachoon *et al.* 2001). Des résultats similaires ont aussi été rapportés suite à l'évaluation d'un ensemble d'extraction du même fabricant, soit le Fast DNA spin Kit for soil (Persoh *et al.* 2008). Les essais ayant pour but d'améliorer significativement la pureté des produits d'extraction sans entraîner de perte ou de contamination supplémentaire de l'ADN ont été infructueux et le protocole initial a finalement été adopté tel quel. Nous y avons néanmoins ajouté une étape de purification des acides humiques sur colonne de PVPP, tel que préconisé par Anouk Martellini lors d'un projet similaire dans le laboratoire du Pr. Richard Villemur (Martellini *et al.* 2005). L'analyse des échantillons d'ADN total par électrophorèse sur gel d'agarose nous a révélé que ceux qui présentaient une moindre qualité étaient généralement ceux ayant subi une homogénéisation intensifiée par l'utilisation d'une deuxième bille de céramique (p. ex. l'échantillon d'eau usée de Rosemère-Lorraine) ou ayant nécessité plusieurs purifications sur colonne de PVPP (p. ex. l'échantillon 26-2008-C) (Figure 3.1 et Figure 3.17). Un ADN matrice hautement abimé sera moins disponible pour l'amplification PCR, ce qui peut affecter la limite de détection (Demeke et Jenkins 2009). Il est donc préférable

d'homogénéiser les échantillons avec une seule bille de céramique et de minimiser les étapes de purification.

Est-ce que l'ADN contenu dans chaque échantillon d'eau initial a été totalement récupéré suite à la filtration, l'homogénéisation, l'extraction et la purification ? Nous n'avons pas inclus de contrôle interne dans nos échantillons pour quantifier les rendements de ces étapes de préparation mais il est fort probable que les pertes aient été considérables. Premièrement, une étude comparative a déjà démontré que l'ensemble FastDNA SPIN fournissait des rendements d'extraction supérieurs à ceux d'autres ensembles commerciaux mais que ce taux de récupération n'équivalait qu'à 15,5 % à 43,3 % de l'ADN total d'un échantillon environnemental (Mumy et Findlay 2004). Aussi, au cours de l'optimisation de la méthodologie de purification de l'ADN, l'analyse de nos produits d'extraction et de purification par électrophorèse sur gel d'agarose nous a permis de constater que les passages répétés sur colonne de PVPP pouvaient entraîner une perte significative de l'ADN total (résultats non montrés). Le PVPP est couramment utilisé pour purifier les acides humiques présents dans les produits d'extraction d'ADN obtenus à partir d'échantillons d'eau, de sol, de fumier, de compost ou d'ossements (LaMontagne *et al.* 2002; Trochimchuk *et al.* 2003; Martellini *et al.* 2005; Sutlovic *et al.* 2007). La présence des substances humiques est particulièrement problématique lorsqu'on doit quantifier les acides nucléiques par absorbance ou les amplifier par PCR (Bachoon *et al.* 2001). Malgré les pertes encourues par la purification, il a quand même été jugé préférable d'avoir un produit d'extraction en moins grande quantité mais exempt d'inhibiteurs de PCR plutôt que de risquer d'obtenir des faux résultats négatifs (Figure 3.18 et Figure 3.19). La majorité des produits d'extraction d'ADN des eaux de surface ont pu être amplifiés par des amorces consensuelles ciblant le gène de l'ARNr 16S (Figure 3.18 et Figure 3.19). Toutefois, les échantillons de 2009-A #27, #29, #30 et #39 et de 2009-B #46 n'ont pas généré de produits d'amplification, soit à cause d'inhibiteurs enzymatiques, soit en raison d'une trop faible concentration en ADN bactérien dans les produits d'extraction. Nous considérons donc que ces échantillons sont susceptibles d'avoir présenté de faux résultats négatifs. Il aurait été intéressant de vérifier si, tel que rapporté dans d'autres études, les rendements d'extraction et de purification auraient pu être améliorés en utilisant la technologie des billes magnétiques liant l'ADN total (Hopwood *et al.* 1996; Maher *et al.* 2001) ou encore liant de façon sélective les séquences

hautement conservées de l'ADNmt (Jacobsen 1995; Archer *et al.* 2006). Encore une fois, cette méthodologie est attrayant en raison de la possibilité de la robotiser dans l'éventualité d'un protocole d'analyse à haut débit.

4.6.3 Quantification de la contamination fécale

Le taux de contamination fécale des échantillons d'eau récoltés dans le cadre de ce projet a été évalué par décompte des coliformes thermotolérants. Les procédures de prélèvement, d'entreposage et d'analyse microbiologique des échantillons d'eau ont été effectuées ou supervisées par les microbiologistes du laboratoire du Pr. Pierre Payment.

Une étude ayant effectué la quantification de divers microorganismes indicateurs ou pathogènes dans les eaux du bassin versant de la rivière South Nation a conclu que la densité des coliformes thermotolérants s'avérait utile pour indiquer la présence ou l'absence des microorganismes pathogènes (Wilkes *et al.* 2009). Même si cet indicateur microbien n'est plus recommandé par Santé Canada, il est encore largement utilisé pour l'analyse des eaux de surface destinées à des usages récréatifs (MDDEP 2009; Santé Canada 2009).

Pour simplifier l'évaluation de la distribution spatiale des résultats de décompte de coliformes thermotolérants, les sites d'échantillonnages ont été regroupés selon trois niveaux de contamination. Ces critères de regroupement correspondent à ceux du ministère québécois du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs en ce qui concerne la protection des activités récréatives en eaux de surface (Figure 3.24 et Figure 3.30) (MDDEP 2009). Dans le BVRA, la majorité des sites situés au nord de la MRC de Matawinie ont présenté un taux de contamination inférieure à la limite recommandée par le ministère pour les usages de contacts primaires (≤ 200 UFC / 100 ml) (MDDEP 2009). Cette région du bassin versant était celle ayant la plus faible densité de population humaine (10 habitants par km² en 1999) tout en étant la moins propice à l'agriculture et à l'élevage en raison de ses caractéristiques topographiques et de la moindre qualité de ses sols (MAPAQ 2002). Les sites situés dans la portion sud du BVRA ont montré un taux de contamination fécale jugés inadéquats pour les usages de contacts primaires (> 200 UFC / 100 ml) ou secondaires (> 1000 UFC / 100 ml). Ces résultats sont attribuables aux fortes densités de populations humaines et animales des municipalités à vocation agricole qu'on y retrouve.

En effet, la plus grande partie de la zone agricole lanaudoise se retrouve entre autres dans les MRC de Montcalm (21,4 %) et de Joliette (15,8 %) situées dans le sud du BVRA (MAPAQ 2002).

En ce qui concerne le BVRSN, une procédure similaire a été adoptée pour visualiser la distribution de la contamination fécale sur le territoire. Toutefois, étant donné la variation du moment et de la fréquence d'échantillonnage entre les sites, nous avons considéré la valeur moyenne de tous les décomptes significatifs effectués pour chaque site (Tableau 3.VII et Figure 3.30). Précisons toutefois que les écarts types associés à ces valeurs sont considérables. À l'exception de la prise d'eau de la communauté de Casselman (site # 01), tous les sites d'échantillonnage avaient un taux moyen de contamination fécale excédant les critères d'usages direct (10 sites) ou indirect (12 sites). Cette pollution semblait se concentrer surtout dans le ruisseau Butternut, le drain Blanchard, le drain Bisailon et la fosse de drainage rural.

4.6.4 Identification des sources de contamination fécale dans les eaux usées et les eaux de surface

En regard des résultats relativement élevés de quantification de la contamination fécale dans le territoire sud du BVRA et à travers le BVRSN, nous avons émis l'hypothèse que les marqueurs mitochondriaux retrouvés dans ces eaux de surface seraient surtout ceux d'humain et d'espèces d'élevage.

Cette présomption était renforcée par les nombreux résultats positifs rapportés dans la littérature quant au dépistage d'ADNmt dans des échantillons environnementaux. D'abord, en 2005, Martellini *et al.* avaient été en mesure de détecter des marqueurs mitochondriaux de l'humain, du porc, du bœuf et du mouton dans les eaux de surface de la rivière l'Assomption et des marqueurs de l'humain et du bœuf dans de l'eau de ruissellement d'une terre agricole suite à l'épandage de fumier de bœuf (Martellini *et al.* 2005). À leur tour, Caldwell *et al.* ont développé une méthodologie ayant détecté des marqueurs mitochondriaux de l'humain, du bœuf et du porc dans des effluents contaminés par ces espèces (Caldwell *et al.* 2007). L'amélioration de leur méthodologie leur a aussi permis de retrouver des marqueurs mitochondriaux de l'humain, du bœuf, du chien et du chat dans

les eaux usées municipales (Caldwell et Levine 2009). Schill et Mathes ont aussi détecté de l'ADNmt dans les eaux usées municipales (Schill et Mathes 2008). Finalement, des travaux effectués récemment dans le laboratoire du Pr. Richard Villemur ont permis de dépister la présence de marqueurs mitochondriaux de l'humain, du bœuf, du porc et du coq dans différentes eaux de surface et eaux usées, ces dernières contenant aussi de l'ADNmt du mouton (Kortbaoui *et al.* 2009).

La méthode mise au point dans le cadre du présent projet de recherche a aussi été appliquée à l'analyse d'eaux usées, en l'occurrence celles de la station de traitement de Rosemère-Lorraine (Figure 2.1 et Figure 2.2). Cette analyse aura permis de valider l'efficacité de notre méthodologie et de détecter les marqueurs mitochondriaux de plusieurs espèces, soit l'humain, le porc, le bœuf, le coq et le cheval (Figure 3.7). Le dépistage de l'ADNmt humain était attendu en raison de l'importante population contribuant à ces eaux usées. Toutefois, il a été surprenant de retrouver autant d'espèces d'élevage, en particulier le cheval. Ces résultats n'ont pas pu être validés en raison du manque d'informations concernant les élevages animaux présents sur le territoire desservi par cette station de traitement. On ne peut donc pas confirmer que ces marqueurs mitochondriaux puissent provenir de fermes d'élevage ou du ruissellement de terres agricoles amendées par du fumier. Il est aussi possible qu'ils proviennent de déchets alimentaires domestiques ayant été vidangés via les eaux grises ou encore de déchets d'abattoirs. Dans l'éventualité où cet ADNmt proviendrait d'une carcasse animale enterrée, la persistance et le transport de l'ADN mitochondrial dans le sol auraient été influencées par les conditions de conservation et le ruissellement. Une étude a permis d'évaluer par amplification PCR quantitative qu'après 147 jours de compostage, les tissus d'une carcasse de bœuf présentent une diminution de plus de 93% du nombre de copies de l'ADN mitochondrial (Xu *et al.* 2009), ce qui diminue les chances qu'elles se retrouvent dans le sol et les eaux de surface et qu'elles y soient éventuellement détectées. Une hypothèse alternative plus probable serait que l'ADNmt non-humain retrouvé dans les eaux usées proviendrait de résidus alimentaires partiellement digérés, libérés dans les fèces puis rejetés dans les eaux usées en même temps que les matières fécales humaines tel que proposé et démontré par Caldwell (2008).

En comparant la localisation des marqueurs mitochondriaux et les taux de coliformes thermotolérants, on remarque que de l'ADNmt a été détecté autant au niveau

des sites fortement contaminés (p. ex. BVRA #08; BVRSN #22) que de ceux faiblement contaminés (p. ex. BRVA #39 et 40; BVRSN #01) (Figure 3.24, Figure 3.25, Figure 3.26, Figure 3.27, Figure 3.28, Figure 3.29, Figure 3.30, Figure 3.31, Figure 3.32, Figure 3.33 et Figure 3.34). Aussi, certains sites fortement contaminés n'ont révélé la présence d'aucune des espèces ciblées par l'étude (p. ex. BVRA #33; BVRSN #18). Cette absence ou faiblesse de corrélation entre les décomptes d'indicateurs traditionnels et la présence/absence d'indicateurs de la source a aussi été rapportée dans d'autres études s'intéressant à des marqueurs tels que les polyomavirus humains, les enterovirus, le virus de l'hépatite A, la turbidité, le nitrate ou encore l'ADNmt (McQuaig *et al.* 2006; Noble *et al.* 2006; Caldwell et Levine 2009; Henjum *et al.* 2010). Il est possible que, dans l'environnement, la différence de persistance des cellules épithéliales, des mitochondries ou des virus par rapport à celle des bactéries puisse expliquer en partie la relation discordante entre la présence de ces marqueurs et celle des bactéries indicatrices (Noble *et al.* 2006). En ce qui concerne les virus, Payment et Locas affirment que, depuis plus de vingt ans, leurs observations de microorganismes pathogènes dans différents types d'eau (incluant des eaux de surface) indiquent que les virus survivent dans l'eau ambiante et que leur quantification ne peut pas y être prédite par des modèles statistiques basés sur les indicateurs bactériens (Payment et Locas 2010). En ce qui concerne le marqueur bactérien *Bacteroides*, il a été démontré que la détection spécifique au bœuf corrélait avec les coliformes thermotolérants (Lee *et al.* 2008) alors que les résultats de la détection spécifique à l'humain oscillaient entre l'absence de corrélation significative (Okabe *et al.* 2007) et la présence d'une corrélation positive (Savichtcheva *et al.* 2007).

Dans le BVRA, les espèces dont on a détecté l'ADNmt en 2008 et/ou 2009 étaient l'humain, le porc, le bœuf, le mouton et le coq. Dans le BVRSN, il s'agissait de l'humain, du porc, du bœuf et de la chèvre. Dans ces deux bassins versants, l'occurrence de marqueurs mitochondriaux était significativement plus fréquente pour l'humain que pour les autres espèces. Ces résultats laissent supposer que la contamination fécale serait plus souvent attribuable aux eaux usées et systèmes septiques municipaux qu'aux pratiques des agriculteurs. Toutefois, des études plus poussées seraient nécessaires pour pouvoir émettre de réelles conclusions, notamment en se basant sur des résultats consistants dans le temps et l'espace, ce qui n'était pas le cas ici. En fait, l'occurrence de marqueurs mitochondriaux dans les eaux de surface n'a pas présenté de continuité spatiale entre les

sites d'échantillonnages situés en amont et en aval d'un même cours d'eau. Finalement, on peut émettre l'hypothèse que, malgré le respect des bonnes pratiques de laboratoire et l'utilisation de contrôles négatifs, certains résultats positifs pour l'humain auraient pu être attribuables à une contamination au laboratoire, tel que constaté dans une étude similaire de Baker-Austin *et al.* (2010).

Les analyses biomoléculaires effectuées à partir des échantillons du BVRA de 2008 et 2009 ont comporté plusieurs réplicats de filtration et d'amplification (Figure 3.22 et Figure 3.23). D'abord, il s'avère que pour toutes les espèces détectées, l'analyse des échantillons de 2008 a généré plus de résultats positifs que l'analyse des échantillons prélevés en 2009. Cela peut naturellement s'expliquer par une variation temporelle de l'intensité ou de la source de pollution fécale à chaque site mais il est aussi probable qu'une altération de l'ADN se soit produite lors de la préparation ou de la manipulation des échantillons de 2009, entraînant conséquemment une perte de sensibilité. De plus, il fut constaté que pour un même échantillon d'eau, les résultats des analyses variaient beaucoup et n'étaient pas reproductibles (Tableau 3.V). Dans tous les cas (sauf BVRA #43) où l'ADNmt d'une espèce autre que l'humain était détectée, nous n'avons pas été en mesure de reproduire le résultat positif, que ce soit à partir de l'ADN total provenant du même produit d'extraction de rétentat ou d'une autre filtration. Une variation a aussi été constatée lorsque nous avons tenté d'appliquer une autre méthode d'amplification nPCR utilisant des paires d'amorces différentes. Le dépistage de l'ADNmt dans 52 échantillons par notre méthode et par celle de Randa Kortbaoui a résulté en un total de 30 échantillons positifs (toutes espèces confondues) dont seulement 5 étaient similaires pour les deux méthodes (Tableau 3.IV). Cela suggère que la stratégie d'analyse et la conception des amorces ont un impact significatif sur les résultats obtenus. Par exemple, il est probable que la limite de détection de notre méthode ait été influencée par la grande taille de l'amplicon d'environ 2 kb généré par les amorces consensuelles MI50. En effet, l'efficacité d'amplification d'un tel fragment peut être fortement diminuée lorsque l'ADNmt est brisé en raison des conditions *in situ* précédant l'échantillonnage ou des manipulations *in vitro* effectuées après l'échantillonnage.

4.6.5 Pertinence de la méthode

En 2002, des experts en microbiologie de l'environnement, en biologie moléculaire et en détection microbienne se sont réunis pour définir des critères permettant d'évaluer et de valider les méthodes d'identification des sources de contamination fécale. Il est intéressant d'évaluer la méthode développée dans le présent projet en regard de ces recommandations concernant la mesure de la fiabilité, la pertinence pour les gestionnaires, le coût et la logistique (Griffith *et al.* 2003).

D'abord, notre méthode a fait preuve d'une bonne fiabilité en ce qui concerne sa grande spécificité qui permettait une haute résolution de discrimination entre les espèces animales et assurait que le marqueur mitochondrial identifiait adéquatement la source présumée. Aussi, d'autres études ont démontré que le dépistage des marqueurs mitochondriaux dans l'environnement ne semblait pas être affecté par la matrice d'eau elle-même, c'est-à-dire que la détection de suspensions fécales a pu être réalisée autant dans de l'eau pure stérile, souterraine, de surface, usée ou de mer (Schill et Mathes 2008; Baker-Austin *et al.* 2009; Baker-Austin *et al.* 2010). Toutefois, en regard des résultats obtenus avec les eaux de surface de bassins versants, la reproductibilité semble problématique, ce qui diminue la fiabilité de notre méthode. Cette fiabilité peut aussi être influencée par la stabilité temporelle des marqueurs mitochondriaux. Il a déjà été établi qu'un échantillon d'eau usée conservé 15 jours à température ambiante pouvait encore contenir de l'ADNmt humain détectable par PCR multiplex (Martellini *et al.* 2005). Une expérience similaire a démontré que la détection était aussi possible par nPCR après plusieurs mois d'incubation à 4 °C (Kortbaoui *et al.* 2009). Pour ce qui est des eaux de rivière, plusieurs recherches y ont étudié la persistance de divers ADN bactériens ou viraux mais aucune n'a encore été effectuée pour l'ADNmt des cellules épithéliales rejetées via les fèces (Kreader 1998; Bae et Wuertz 2009; Muniesa *et al.* 2009; Ottoson 2009; Walters *et al.* 2009).

Une bonne méthode de détection devrait aussi être pertinente du point de vue des gestionnaires. Le fait que nous soyons en mesure de détecter directement l'espèce animale qui est à l'origine de la contamination fait en sorte que, indirectement, il est possible de cibler l'activité qui cause la contamination et d'y orienter les mesures correctives. Est-ce que les résultats obtenus par notre méthode sont facilement communicables aux autorités responsables des eaux et au public ? Nous croyons que oui,

notamment en raison du format présence/absence de l'indicateur ainsi que de la simplicité du lien entre l'ADN ciblé et l'animal à la source de la contamination.

D'un point de vue technique, nous croyons que les coûts et la logistique associés à notre méthode sont raisonnables et facilement adaptables aux moyens financiers et aux installations habituellement retrouvées dans les laboratoires de biologie moléculaire. D'abord, l'amplification PCR est une méthodologie très répandue et facile d'exécution. Aussi, il a été démontré dans le présent projet qu'il était possible de travailler avec des stratégies de détection qui n'impliquaient pas de réactifs de qPCR dispendieux et/ou qui permettaient de diminuer les besoins en personnel technique via la robotisation. En regard des résultats obtenus avec les eaux de surface de bassins versants où le dépistage a révélé la présence de l'ADNmt de six espèces animales seulement, notre méthode présente l'avantage de pouvoir planifier la quantité et la variété d'analyses en les restreignant en fonction des sources probables de contamination fécale. Par exemple, les gestionnaires d'une plage contaminée de façon récurrente et située en région urbaine seraient en mesure de limiter leur investissement au dépistage de l'ADNmt de l'humain et du goéland seulement. Cette approche permet beaucoup de souplesse en comparaison avec d'autres méthodologies comme celle des biopuces. Les biopuces sont constitués d'un support physique de dimension limitée (p. ex. une lame de microscope) où sont immobilisés des arrangements ordonnés de polynucléotides (sondes) dont la capacité à s'hybrider avec les polynucléotides complémentaires d'un échantillon marqué (cible) permet à l'observateur d'identifier la composition de la cible selon les sondes où l'hybridation a eu lieu (Lemarchand *et al.* 2004). Comme l'ont démontré indirectement Kortbaoui *et al.* (2010), cette technologie pourrait être appliquée à l'identification spécifique des marqueurs mitochondriaux dans les eaux de surface mais en raison des coûts liés à chaque analyse, elle s'avèrerait plutôt appropriée aux cas où un grand nombre d'espèces doivent être dépistées dans un même échantillon d'eau. Il serait d'ailleurs intéressant de concevoir une biopuce regroupant des sondes correspondant à des séquences d'ADN spécifiques à certaines bactéries pathogènes, à des indicateurs traditionnels de la contamination fécale ou encore à des marqueurs microbiens de la source comme *Bacteroides*. En effet, de plus en plus de scientifiques s'intéressant à la problématique des sources de contamination fécale en eaux de surface préconisent l'approche dite « de la boîte à outils » qui consiste à tenir compte

d'un ensemble d'outils d'analyse de la qualité de l'eau tels que les paramètres physiques, chimiques et microbiens traditionnels ainsi que les outils de dépistage spécifiques comme la méthode proposée par le présent projet.

CONCLUSION

Plusieurs approches ont été proposées pour détecter spécifiquement les sources de contamination fécale dans les eaux de surface. Parmi celles-ci, l'utilisation de l'ADN mitochondrial comme marqueur spécifique semble être prometteuse dans la mesure où différents projets de recherches ont été en mesure de démontrer la faisabilité, la spécificité et la sensibilité de sa détection dans divers types d'eaux contaminées par des matières fécales. Dans le cadre du présent projet de recherche, il a été démontré que le suivi des marqueurs mitochondriaux de plusieurs espèces animales pouvait être appliqué à l'étude des sources de contamination fécale dans des bassins versants où la problématique est récurrente. Pour ce faire, une nouvelle méthodologie d'amplification nPCR à haut débit a été mise au point. Sa validation avec des tissus animaux et des échantillons d'eaux usées a démontré que l'amplification préalable des marqueurs mitochondriaux par une paire d'amorces consensuelles aux vertébrés permettait d'améliorer l'exécution et la sensibilité des essais. Aussi, nos 14 paires d'amorces d'amplification nPCR se sont avérées hautement spécifiques pour détecter l'ADN mitochondrial de différentes espèces susceptibles d'être à la source d'une contamination. L'analyse des eaux de surface du bassin versant de la rivière l'Assomption et du bassin versant de la rivière South Nation a toutefois révélé que la majorité des marqueurs mitochondriaux détectés étaient d'origine humaine et que seulement cinq autres espèces étaient parfois identifiées. De plus, les analyses ont présenté une faible reproductibilité, ce qui laisse supposer qu'une ou plusieurs étapes de manipulations induisent une variabilité dans les résultats. Ayant démontré que notre protocole pouvait être éventuellement adapté à l'analyse à haut débit et à moindre coût, des projets d'envergure pourraient être envisagés. Par exemple, il serait intéressant d'explorer et de valider davantage le potentiel de notre méthode en l'appliquant au dépistage des marqueurs mitochondriaux d'un nombre plus restreint d'espèces animales significatives dans des eaux de surface dont l'échantillonnage serait plus significatif d'un point de vue spatial, temporel et biostatistique.

LISTE DE RÉFÉRENCES

- Abd-El-Haleem, D., Z. H. Kheiralla, S. Zaki, A. A. Rushdy et W. Abd-El-Rahiem** (2003). Multiplex-PCR and PCR-RFLP assays to monitor water quality against pathogenic bacteria. *Journal of Environmental Monitoring* 5(6): 865-870.
- Agriculture et Agroalimentaire Canada.** (2008). South Nation Watershed: Watershed Evaluation of Beneficial Management Practices. Consulté le 10 juillet 2010. <http://www4.agr.gc.ca/AAFC-AAC/display-afficher.do?id=1228864413685&lang=eng>.
- Ahmed, W., A. Goonetilleke, D. Powell, K. Chauhan et T. Gardner** (2009a). Comparison of molecular markers to detect fresh sewage in environmental waters. *Water Research* 43(19): 4908-4917.
- Ahmed, W., S. Sawant, F. Huygens, A. Goonetilleke et T. Gardner** (2009b). Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in surface waters determined by quantitative PCR. *Water Research* 43(19): 4918-4928.
- Albaugh, G. P., V. Iyengar, A. Lohani, M. Malayeri, S. Bala et P. P. Nair** (1992). Isolation of exfoliated colonic epithelial cells, a novel, non-invasive approach to the study of cellular markers. *International Journal of Cancer* 52(3): 347-350.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et P. Walter** (2004). Biologie moléculaire de la cellule. Paris, Flammarion Médecine-Sciences.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller et D. J. Lipman** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17): 3389-3402.
- Andreasson, H., M. Nilsson, B. Budowle, H. Lundberg et M. Allen** (2006). Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Science International* 164(1): 56-64.
- APHA, AWWA et WEF** (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, American Public Health Association, 1368 pages.
- Arbeli, Z. et C. L. Fuentes** (2007). Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. *Fems Microbiology Letters* 272(2): 269-275.
- Archer, M. J., B. C. Lin, Z. Wang et D. A. Stenger** (2006). Magnetic bead-based solid phase for selective extraction of genomic DNA. *Analytical Biochemistry* 355(2): 285-297.

- Ashbolt, N. J., W. O. K. Grabow et M. Snozzi (2001).** Indicators of microbial water quality. *Water quality - Guidelines, standards and health: Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease*. W. H. Organization. London, IWA Publishing: 289-316.
- Bachoon, D. S., E. Otero et R. E. Hodson (2001).** Effects of humic substances on fluorometric DNA quantification and DNA hybridization. *Journal of Microbiological Methods* 47(1): 73-82.
- Bae, S. et S. Wuertz (2009).** Rapid decay of host-specific fecal Bacteroidales cells in seawater as measured by quantitative PCR with propidium monoazide. *Water Research* 43(19): 4850-4859.
- Baker-Austin, C., J. Morris, J. A. Lowther, R. Rangdale et D. N. Lees (2009).** Rapid identification and differentiation of agricultural faecal contamination sources using multiplex PCR. *Letters in Applied Microbiology* 49(4): 529-532.
- Baker-Austin, C., R. Rangdale, J. Lowther et D. N. Lees (2010).** Application of mitochondrial DNA analysis for microbial source tracking purposes in shellfish harvesting waters. *Water Science and Technology* 61(1): 1-7.
- Balleste, E., X. Bonjoch, L. A. Belanche et A. R. Blanch (2010).** Molecular indicators used in the development of predictive models for microbial source tracking. *Applied and Environmental Microbiology* 76(6): 1789-1795.
- Ballin, N. Z., F. K. Vogensen et A. H. Karlsson (2009).** Species determination - Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science* 83(2): 165-174.
- Bej, A. K., J. L. Dicesare, L. Haff et R. M. Atlas (1991).** Detection of *Escherichia Coli* and *Shigella* spp. in Water by Using the Polymerase Chain-Reaction and Gene Probes for Uid. *Applied and Environmental Microbiology* 57(4): 1013-1017.
- Bej, A. K., R. J. Steffan, J. Dicesare, L. Haff et R. M. Atlas (1990).** Detection of Coliform Bacteria in Water by Polymerase Chain-Reaction and Gene Probes. *Applied and Environmental Microbiology* 56(2): 307-314.
- Bensasson, D., D. Zhang, D. L. Hartl et G. M. Hewitt (2001).** Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution* 16(6): 314-321.
- Bernhard, A. E. et K. G. Field (2000).** A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 66(10): 4571-4574.
- Berthelet, M., L. G. Whyte et C. W. Greer (1996).** Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns. *Fems Microbiology Letters* 138(1): 17-22.

- Biswas, A. K.** (2004). Integrated water resources management: A reassessment - A water forum contribution. *Water International* 29(2): 248-256.
- Blanch, A. R., L. Belanche-Munoz, X. Bonjoch, J. Ebdon, C. Gantzer, F. Lucena, J. Ottoson, C. Kourtis, A. Iversen, I. Kuhn, L. Moce, M. Muniesa, J. Schwartzbrod, S. Skraber, G. T. Papageorgiou, H. Taylor, J. Wallis et J. Jofre** (2006). Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Applied and Environmental Microbiology* 72(9): 5915-5926.
- BLAST.** (2010). BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Consulté le 10 juillet 2010. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Bonde, G. J.** (1966). Bacteriological methods for estimation of water pollution. *Health Laboratory Science* 3(2): 124-128.
- Boore, J. L.** (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27(8): 1767-1780.
- Brion, G. M. et S. Lingireddy** (1999). A neural network approach to identifying non-point sources of microbial contamination. *Water Research* 33(14): 3099-3106.
- Brouillette, D.** (2007). Qualité de l'eau de la rivière des Mille Îles 2000-2005. Québec, Ministère du Développement durable de l'Environnement et des Parc, Gouvernement du Québec, 36 pages.
- Brouillette, D.** (2010). La gestion des eaux de baignade: Un monde de différences! *Vecteur Environnement* 43(3): 18-21.
- Bruford, M. W., D. G. Bradley et G. Luikart** (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics* 4(11): 900-910.
- Brun, A.** (2009). L'approche par bassin versant: le cas du Québec. *Options politiques* 5(7): 36-42.
- Caldwell, J. M. et J. F. Levine** (2009). Domestic wastewater influent profiling using mitochondrial real-time PCR for source tracking animal contamination. *Journal of Microbiological Methods* 77(1): 17-22.
- 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. *Environmental Science & Technology* 41(9): 3277-3283.
- Cao, Y. P., J. F. Griffith et S. B. Weisberg** (2009). Evaluation of optical brightener photodecay characteristics for detection of human fecal contamination. *Water Research* 43(8): 2273-2279.

- CARA.** (2006). Corporation de l'Aménagement de la Rivière l'Assomption: Territoire d'intervention. Consulté le 10 juillet 2010. <http://www.cara.qc.ca/territoire/territoire.html>.
- Cavelier, L., A. Johannisson et U. Gyllensten** (2000). Analysis of mtDNA copy number and composition of single mitochondrial particles using flow cytometry and PCR. *Experimental Cell Research* 259(1): 79-85.
- Chaler, R., B. R. T. Simoneit et J. O. Grimalt** (2001). Bile acids and sterols in urban sewage treatment plants. *Journal of Chromatography A* 927(1-2): 155-160.
- Cheung, V. G. et S. F. Nelson** (1996). Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(25): 14676-14679.
- Clay Montier, L. L., J. J. Deng et Y. Bai** (2009). Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *Journal of Genetics & Genomics* 36(3): 125-131.
- Clayton, D. A.** (1992). Structure and function of the mitochondrial genome. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 15(4): 439-447.
- Close, M. E., L. R. Hodgson et G. Tod** (1989). Field evaluation of fluorescent whitening agents and sodium tripolyphosphate as indicators of septic tank contamination in domestic wells. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 23(4): 563 - 568.
- Conservation Ontario.** (2009). History of Conservation Authorities. Consulté le 10 juillet 2010. <http://www.conservation-ontario.on.ca/about/history.html>.
- Cooper, J. K., G. Sykes, S. King, K. Cottrill, N. V. Ivanova, R. Hanner et P. Ikonomi** (2007). Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 43(10): 344-351.
- de Lau, W., N. Barker et H. Clevers** (2007). WNT signaling in the normal intestine and colorectal cancer. *Frontiers in Bioscience* 12: 471-491.
- Demeke, T. et G. R. Jenkins** (2009). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
- Dombek, P. E., L. K. Johnson, S. T. Zimmerley et M. J. Sadowsky** (2000). Use of repetitive DNA sequences and the PCR To differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology* 66(6): 2572-2577.

- Dorai-Raj, S., O. G. J et E. Colleran (2009).** Specificity and sensitivity evaluation of novel and existing Bacteroidales and Bifidobacteria-specific PCR assays on feces and sewage samples and their application for microbial source tracking in Ireland. *Water Research* 43(19): 4980-4988.
- Drolet, J.-Y. et S. Pigeon (2008).** Suivi 2007 du Portrait agroenvironnemental des fermes du Québec: Paramètres agroenvironnementaux présentés par région administrative Québec, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, pages.
- Edberg, S. C., E. W. Rice, R. J. Karlin et M. J. Allen (2000).** *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)*(29): 106S-116S.
- Fajardo, V., I. Gonzalez, I. Lopez-Calleja, I. Martin, M. Rojas, T. Garcia, P. E. Hernandez et R. Martin (2007).** PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. *Meat Science* 76(4): 644-652.
- Frank, J. A., C. I. Reich, S. Sharma, J. S. Weisbaum, B. A. Wilson et G. J. Olsen (2008).** Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74(8): 2461-2470.
- Fremaux, B., T. Boa et C. K. Yost (2010).** Quantitative real-time PCR assays for sensitive detection of Canada goose-specific fecal pollution in water sources. *Applied and Environmental Microbiology* 76(14): 4886-4889.
- Fremaux, B., J. Gritzfeld, T. Boa et C. K. Yost (2009).** Evaluation of host-specific Bacteroidales 16S rRNA gene markers as a complementary tool for detecting fecal pollution in a prairie watershed. *Water Research* 43(19): 4838-4849.
- Fricker, E. J. et C. R. Fricker (1994).** Application of the Polymerase Chain-Reaction to the Identification of *Escherichia Coli* and Coliforms in Water. *Letters in Applied Microbiology* 19(1): 44-46.
- Friedman, S. D., E. M. Cooper, L. Casanova, M. D. Sobsey et F. J. Genthner (2009).** A reverse transcription-PCR assay to distinguish the four genogroups of male-specific (F+) RNA coliphages. *Journal of Virological Methods* 159(1): 47-52.
- Fruman, D. A., G. Z. Ferl, S. S. An, A. C. Donahue, A. B. Satterthwaite et O. N. Witte (2002).** Phosphoinositide 3-kinase and Bruton's tyrosine kinase regulate overlapping sets of genes in B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(1): 359-364.

- Fujimura, T., T. Matsumoto, S. Tanabe et F. Morimatsu (2008).** Specific discrimination of chicken DNA from other poultry DNA in processed foods using the polymerase chain reaction. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 72(3): 909-913.
- Fumihito, A., T. Miyake, M. Takada, R. Shingu, T. Endo, T. Gojobori, N. Kondo et S. Ohno (1996).** Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(13): 6792-6795.
- Gangbazo, G. (2004).** Gestion intégrée de l'eau par bassin versant : concept et application. Québec, Ministère de l'Environnement du Québec, Ministère de l'Environnement du Québec, 46 pages.
- Gasiev, A. I. et G. O. Shaikhaev (2008).** Lesions of the mitochondrial genome and ways of its preservation. *Russian Journal of Genetics* 44(4): 373-388.
- Gireesh, T., P. P. Nair et P. R. Sudhakaran (2004).** Studies on the bioavailability of the provitamin A carotenoid, beta-carotene, using human exfoliated colonic epithelial cells. *British Journal of Nutrition* 92(2): 241-245.
- 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. *Environmental Science & Technology* 39(14): 5157-5169.
- Grant, M. A., S. D. Weagant et P. Feng (2001).** Glutamate decarboxylase genes as a prescreening marker for detection of pathogenic *Escherichia coli* groups. *Applied and Environmental Microbiology* 67(7): 3110-3114.
- Graves, A. K., C. Hagedorn, A. Brooks, R. L. Hagedorn et E. Martin (2007).** Microbial source tracking in a rural watershed dominated by cattle. *Water Research* 41(16): 3729-3739.
- Gray, M. W., G. Burger et B. F. Lang (1999).** Mitochondrial evolution. *Science* 283(5407): 1476-1481.
- Gray, M. W., G. Burger et B. F. Lang (2001).** The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biology* 2(6): 1018.1011-1018.1015.
- Gray, M. W., B. F. Lang et G. Burger (2004).** Mitochondria of protists. *Annual Review of Genetics* 38: 477-524.
- Griffith, J. F., L. A. Aumand, I. M. Lee, C. D. McGee, L. L. Othman, K. J. Ritter, K. O. Walker et S. B. Weisberg (2006).** Comparison and verification of bacterial water quality indicator measurement methods using ambient coastal water samples. *Environmental Monitoring and Assessment* 116(1-3): 335-344.

- Griffith, J. F., S. B. Weisberg et C. D. McGee (2003).** Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples. *Journal of Water and Health* 1(4): 141-151.
- Gudnason, H., M. Dufva, D. D. Bang et A. Wolff (2007).** Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Research* 35(19): 1-8.
- Guha, S. et V. K. Kashyap (2005).** Development of novel heminested PCR assays based on mitochondrial 16s rRNA gene for identification of seven pecora species. *BMC Genetics* 6: 42.
- Hall, T. A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Haramoto, E., M. Kitajima, H. Katayama, M. Asami, M. Akiba et S. Kunikane (2009).** Application of real-time PCR assays to genotyping of F-specific phages in river water and sediments in Japan. *Water Research* 43(15): 3759-3764.
- Harwood, V. J., M. Brownell, S. Wang, J. Lepo, R. D. Ellender, A. Ajidahun, K. N. Hellein, E. Kennedy, X. Ye et C. Flood (2009).** Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico. *Water Research* 43(19): 4812-4819.
- Henjum, M. B., R. M. Hozalski, C. R. Wennen, W. Arnold et P. J. Novak (2010).** Correlations between in situ sensor measurements and trace organic pollutants in urban streams. *Journal of Environmental Monitoring* 12(1): 225-233.
- Hofreiter, M., D. Serre, H. N. Poinar, M. Kuch et S. Paabo (2001).** Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics* 2(5): 353-359.
- Holben, W. E., J. K. Jansson, B. K. Chelm et J. M. Tiedje (1988).** DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community. *Applied and Environmental Microbiology* 54(3): 703-711.
- Hopwood, A. J., A. Mannucci et K. M. Sullivan (1996).** DNA typing from human faeces. *International Journal of Legal Medicine* 108(5): 237-243.
- Horakova, K., H. Mlejnkova et P. Mlejnek (2008).** Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: cytochrome bd complex, lactose permease, beta-D-glucuronidase, and beta-D-galactosidase. *Journal of Applied Microbiology* 105(4): 970-976.

- Hundesda, A., C. Maluquer de Motes, N. Albinana-Gimenez, J. Rodriguez-Manzano, S. Bofill-Mas, E. Sunen et R. Rosina Girones (2009).** Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *Journal of Virological Methods* 158(1-2): 130-135.
- INRE. (2009).** Surveillance nationale de la qualité de l'eau. Consulté le 10 juillet 2010. <http://www.ec.gc.ca/inre-nwri/default.asp?lang=Fr&n=43A58067-1>.
- INSPQ (2003a).** Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine: Coliformes fécaux. Groupe scientifique sur l'eau, Gouvernement du Québec, 3 pages.
- INSPQ (2003b).** Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine: Coliformes totaux. Groupe scientifique sur l'eau, Gouvernement du Québec, 4 pages.
- INSPQ (2003c).** Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine: *Escherichia coli*. Groupe scientifique sur l'eau, Gouvernement du Québec, 4 pages.
- INSPQ (2009).** Surveillance des éclosions de maladies d'origine hydrique au Québec. Québec, Direction des risques biologiques environnementaux et occupationnels,, Gouvernement du Québec, pages.
- Ishii, K. et M. Fukui (2001).** Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67(8): 3753-3755.
- ITIS. (2010).** Integrated Taxonomic Information System on-line database. Consulté le 31 mai 2010. <http://www.itis.gov>.
- IUCN. (2010).** IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. Consulté le 25 août 2010. www.iucnredlist.org.
- Iyengar, V., G. P. Albaugh, A. Lohani et P. P. Nair (1991).** Human Stools as a Source of Viable Colonic Epithelial-Cells. *Faseb Journal* 5(13): 2856-2859.
- Jacobsen, C. S. (1995).** Microscale detection of specific bacterial DNA in soil with a magnetic capture-hybridization and PCR amplification assay. *Applied and Environmental Microbiology* 61(9): 3347-3352.
- Jamieson, R., R. Gordon, D. Joy et H. Lee (2004).** Assessing microbial pollution of rural surface waters - A review of current watershed scale modeling approaches. *Agricultural Water Management* 70(1): 1-17.
- Jehaes, E., A. Gilissen, J. J. Cassiman et R. Decorte (1998).** Evaluation of a decontamination protocol for hair shafts before mtDNA sequencing. *Forensic Science International* 94(1-2): 65-71.

- Jenkins, M. W., S. Tiwari, M. Lorente, C. M. Gichaba et S. Wuertz (2009).** Identifying human and livestock sources of fecal contamination in Kenya with host-specific Bacteroidales assays. *Water Research* 43(19): 4956-4966.
- Jobling, M. A. et P. Gill (2004).** Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics* 5(10): 739-751.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 70(8): 4478-4485.
- Juck, D., J. Ingram, M. Prevost, J. Coallier et C. Greer (1996).** Nested PCR protocol for the rapid detection of *Escherichia coli* in potable water. *Canadian Journal of Microbiology* 42(8): 862-866.
- Kamra, A., G. Kessie, J. H. Chen, S. Kalavapudi, R. Shores, I. McElroy, T. Gireesh, P. R. Sudhakaran, S. K. Dutta et P. P. Nair (2005).** Exfoliated colonic epithelial cells: surrogate targets for evaluation of bioactive food components in cancer prevention. *Journal of Nutrition* 135(11): 2719-2722.
- Karlsson, A. O. et G. Holmlund (2007).** Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing. *Forensic Science International* 173(1): 16-20.
- Karsai, A., S. Muller, S. Platz et M. T. Hauser (2002).** Evaluation of a homemade SYBR (R) Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques* 32(4): 790-796.
- Khan, I. U. H., V. Gannon, R. Kent, W. Koning, D. R. Lapen, J. Miller, N. Neumann, R. Phillips, W. Robertson, E. Topp, E. van Bochove et T. A. Edge (2007).** Development of a rapid quantitative PCR assay for direct detection and quantification of culturable and non-culturable *Escherichia coli* from agriculture watersheds. *Journal of Microbiological Methods* 69(3): 480-488.
- Kildare, B. J., C. M. Leutenegger, B. S. McSwain, D. G. Bambic, V. B. Rajal et S. Wuertz (2007).** 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: a Bayesian approach. *Water Research* 41(16): 3701-3715.
- Kortbaoui, R., A. Locas, M. Imbeau, P. Payment et R. Villemur (2009).** Universal mitochondrial PCR combined with species-specific dot-blot assay as a source-tracking method of human, bovine, chicken, ovine, and porcine in fecal-contaminated surface water. *Water Research* 43(7): 2002-2010.

- Kreader, C. A.** (1998). Persistence of PCR-detectable *Bacteroides distasonis* from human feces in river water. *Applied and Environmental Microbiology* 64(10): 4103-4105.
- Lahiff, S., M. Glennon, L. O'Brien, J. Lyng, T. Smith, M. Maher et N. Shilton** (2001). Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meta and bone meal (MBM). *Molecular and Cellular Probes* 15(1): 27-35.
- Lakay, F. M., A. Botha et B. A. Prior** (2007). Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *Journal of Applied Microbiology* 102(1): 265-273.
- LaMontagne, M. G., F. C. Michel, Jr., P. A. Holden et C. A. Reddy** (2002). Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of Microbiological Methods* 49(3): 255-264.
- Lee, C. M., J. F. Griffith, W. Kaiser et J. A. Jay** (2010). Covalently linked immunomagnetic separation/adenosine triphosphate technique (Cov-IMS/ATP) enables rapid, in-field detection and quantification of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in freshwater and marine environments. *Journal of Applied Microbiology* 109(1): 324-333.
- Lee, Y. J., M. Molina, J. W. S. Domingo, J. D. Willis, M. Cyterski, D. M. Endale et O. C. Shanks** (2008). Temporal Assessment of the Impact of Exposure to Cow Feces in Two Watersheds by Multiple Host-Specific PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology* 74(22): 6839-6847.
- Leggate, J., R. Allain, L. Isaac et B. W. Blais** (2006). Microplate fluorescence assay for the quantification of double stranded DNA using SYBR Green I dye. *Biotechnology Letters* 28(19): 1587-1594.
- Lemarchand, K., L. Masson et R. Brousseau** (2004). Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water. *Critical Reviews in Microbiology* 30(3): 145-172.
- Ludt, C. J., W. Schroeder, O. Rottmann et R. Kuehn** (2004). Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31(3): 1064-1083.
- Ludwig, W., G. Mittenhuber et C. G. Friedrich** (1993). Transfer of *Thiosphaera pantotropha* to *Paracoccus denitrificans*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43(2): 363-367.

- Lyautey, E., D. R. Lapen, G. Wilkes, K. McCleary, F. Pagotto, K. Tyler, A. Hartmann, P. Piveteau, A. Rieu, W. J. Robertson, D. T. Medeiros, T. A. Edge, V. Gannon et E. Topp (2007).** Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the South Nation River watershed, Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* 73(17): 5401-5410.
- Lyautey, E., Z. Lu, D. R. Lapen, G. Wilkes, A. Scott, T. Berkers, T. A. Edge et E. Topp (2010).** Distribution and diversity of *Escherichia coli* populations in the South Nation River drainage basin, eastern Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* 76(5): 1486-1496.
- MAAARO. (2010).** Bétail et volaille. Consulté le 29 juin 2010. <http://www.omafra.gov.on.ca/french/stats/livestock/index.html>.
- Maher, N., H. K. Dillon, S. H. Vermund et T. R. Unnasch (2001).** Magnetic bead capture eliminates PCR inhibitors in samples collected from the airborne environment, permitting detection of *Pneumocystis carinii* DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 67(1): 449-452.
- Maheux, A. F., F. J. Picard, M. Boissinot, L. Bissonnette, S. Paradis et M. G. Bergeron (2009).** Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of *Escherichia coli/Shigella* in water samples. *Water Research* 43(12): 3019-3028.
- Maibach, R. C., F. Dutly et M. Altwegg (2002).** Detection of *Tropheryma whipplei* DNA in feces by PCR using a target capture method. *Journal of Clinical Microbiology* 40(7): 2466-2471.
- MAPAQ (2002).** Profil de l'Industrie bioalimentaire de Lanaudière: Synthèse. Gouvernement du Québec, 229 pages.
- MAPAQ (2008).** Profil régional de l'Industrie bioalimentaire au Québec: Estimations pour 2007. Québec, Direction générale des politiques agroalimentaires, Gouvernement du Québec, 152 pages.
- Marsh, I., R. Whittington et D. Millar (2000).** Quality control and optimized procedure of hybridization capture-PCR for the identification of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in faeces. *Molecular and Cellular Probes* 14(4): 219-232.
- 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 Research* 39(4): 541-548.
- McDaniels, A. E., E. W. Rice, A. L. Reyes, C. H. Johnson, R. A. Haugland et G. N. Stelma, Jr. (1996).** Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. *Applied and Environmental Microbiology* 62(9): 3350-3354.

- McQuaig, S. M., T. M. Scott, V. J. Harwood, S. R. Farrah et J. O. Lukasik (2006).** Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. *Applied and Environmental Microbiology* 72(12): 7567-7574.
- McQuaig, S. M., T. M. Scott, J. O. Lukasik, J. H. Paul et V. J. Harwood (2009).** Quantification of Human Polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan Quantitative PCR and Comparison to Other Water Quality Indicators in Water and Fecal Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 75(11): 3379-3388.
- MDDEP (2009).** Critères de qualité de l'eau de surface. Québec, Direction du suivi de l'état de l'environnement, Gouvernement du Québec, 506 pages.
- MENVIQ. (1999).** Portrait régional de l'eau de la région de Lanaudière. Consulté le 10 juillet 2010.
<http://www.bape.gouv.qc.ca/sections/archives/eau/docdeposes/lesdocumdeposes/pr3-14.pdf>.
- Meyer, R. et U. Candrian (1996).** PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 29(1-2): 1-9.
- Ministère de l'Environnement et de la Faune. (1997).** Modifier nos pratiques agricoles... la priorité. Consulté le 10 juillet 2010.
http://www.mddep.gouv.qc.ca/milieu_agri/pratiques-agri/assomption/index.htm.
- Montiel-Sosa, J. F., E. Ruiz-Pesini, J. Montoya, P. Roncales, M. J. Lopez-Perez et A. Perez-Martos (2000).** Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(7): 2829-2832.
- MP Biomedicals. (2010).** Fast DNA Spin Kit, MSDS No. 6540-402. Consulté le 17 mai 2010.
<http://www.mpbio.com/includes/msds/ansi/en/6540-400%20FastDNA%20Kit-1.pdf>.
- Mumy, K. L. et R. H. Findlay (2004).** Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR. *Journal of Microbiological Methods* 57(2): 259-268.
- Muniesa, M., A. Payan, L. Moce-Llivina, A. R. Blanch et J. Jofre (2009).** Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. *Water Research* 43(6): 1559-1564.
- Nath, K., J. W. Sarosy, J. Hahn et C. J. Di Como (2000).** Effects of ethidium bromide and SYBR (R) Green I on different polymerase chain reaction systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 42(1-2): 15-29.

- NCBI. (2010). Organelle Genome Resources. Consulté le 28 juin 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/OrganelleResource.cgi?taxid=33208>.
- New England Biolabs (2007). DyNAzyme™ II Hot Start DNA Polymerase, Version 1.3., 2 pages.
- Nishibori, M., M. Tsudzuki, T. Hayashi, Y. Yamamoto et H. Yasue (2002). Complete nucleotide sequence of the *Coturnix chinensis* (blue-breasted quail) mitochondrial genome and a phylogenetic analysis with related species. *Journal of Heredity* 93(6): 439-444.
- Noble, R. T., J. F. Griffith, A. D. Blackwood, J. A. Fuhrman, J. B. Gregory, X. Hernandez, X. L. Liang, A. A. Bera et K. Schiff (2006). Multitiered approach using quantitative PCR to track sources of fecal pollution affecting Santa Monica Bay, California. *Applied and Environmental Microbiology* 72(2): 1604-1612.
- O'Grady, D. (2008). Point to non-point phosphorus trading in the South Nation River watershed. *Environmental Economics and Investment Assessment II*. K. Aravossis, C. A. Brebbia et N. Gomez. Southampton, Wit Press/Computational Mechanics Publications: 189-195.
- Okabe, S., N. Okayama, O. Savichtcheva et T. Ito (2007). Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(4): 890-901.
- Oliveira, C. G., R. A. Martinez et F. A. Gaiotto (2007). DNA extraction from bristles and quills of *Chaetomys subspinosus* (Rodentia: Erethizontidae) using a novel protocol. *Genetics and Molecular Research* 6(3): 657-666.
- Ono, K., M. Satoh, T. Yoshida, Y. Ozawa, A. Kohara, M. Takeuchi, H. Mizusawa et H. Sawada (2007). Species identification of animal cells by nested PCR targeted to mitochondrial DNA. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 43(5-6): 168-175.
- Ottoson, J. R. (2009). Bifidobacterial survival in surface water and implications for microbial source tracking. *Canadian Journal of Microbiology* 55(6): 642-647.
- Parker, G. T., R. L. Droste et K. J. Kennedy (2008). Modeling the effect of agricultural best management practices on water quality under various climatic scenarios. *Journal of Environmental Engineering and Science* 7(1): 9-19.
- Parson, W., K. Pegoraro, H. Niederstatter, M. Fogger et M. Steinlechner (2000). Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine* 114(1-2): 23-28.

- Payment, P., F. Affoyon et M. Trudel (1988).** Detection of animal and human enteric viruses in water from the Assomption River and its tributaries. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 967-973.
- Payment, P., A. Berte, M. Prévost, B. Ménard et B. Barbeau (2000).** Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence River (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water. *Canadian Journal of Microbiology* 46: 565-576.
- Payment, P., M. Waite et A. Dufour (2003).** Introducing Parameters For The Assessment of Drinking Water Quality. *Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving Approaches and Methods*. W. H. Organisation et OECD. London, IWA Publishing: 47-77.
- Payment, P. et A. Locas (2010).** Pathogens in Water: Value and Limits of Correlation with Microbial Indicators. *Ground Water* 49(1): 4-11.
- Pellissier, F., C. M. Glogowski, S. F. Heinemann, M. Ballivet et V. Ossipow (2006).** Lab assembly of a low-cost, robust SYBR green buffer system for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 350(2): 310-312.
- Persoh, D., S. Theuerl, F. Buscot et G. Rambold (2008).** Towards a universally adaptable method for quantitative extraction of high-purity nucleic acids from soil. *Journal of Microbiological Methods* 75(1): 19-24.
- Pizzato, M., O. Erlwein, D. Bonsall, S. Kaye, D. Muir et M. O. McClure (2009).** A one-step SYBR Green I-based product-enhanced reverse transcriptase assay for the quantitation of retroviruses in cell culture supernatants. *Journal of Virological Methods* 156(1-2): 1-7.
- Prescott, L. M., J. P. Harley et D. A. Klein (2003).** Microbiologie. Bruxelles, De Boeck, 1137 pages.
- 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. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* 65(1): 1-142.
- Robin, E. D. et R. Wong (1988).** Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology* 136(3): 507-513.
- Rojas, M., I. Gonzalez, M. A. Pavon, N. Pegels, P. E. Hernandez, T. Garcia et R. Martin (2010).** Polymerase chain reaction assay for verifying the labeling of meat and commercial meat products from game birds targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. *Poultry Science* 89(5): 1021-1032.

- Rompre, A., P. Servais, J. Baudart, M. R. de-Roubin et P. Laurent (2002).** Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods* 49(1): 31-54.
- Rudi, K., B. Moen, S. M. Dromtorp et A. L. Holck (2005).** Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71(2): 1018-1024.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 73(12): 3945-3957.
- Russell, J. B. et J. L. Rychlik (2001).** Factors That Alter Rumen Microbial Ecology. *Science* 292(5519): 1119-1122.
- Rychlik, W., W. J. Spencer et R. E. Rhoads (1990).** Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research* 18(21): 6409-6412.
- SantaLucia, J. (1998).** A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(4): 1460-1465.
- Santé Canada. (2006).** Les bactéries pathogènes d'origine hydrique : micro-organismes préoccupants courants et émergents. Consulté le 10 juillet 2010. <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/pathogens-pathogenes/index-fra.php>.
- Santé Canada. (2009).** Recommandations au sujet de la qualité des eaux utilisées à des fins récréatives au Canada: Troisième édition. Consulté le 10 juillet 2010. http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/consult/_2009/water_rec-eau/water_rec-eau-fra.pdf.
- Santé et Bien-être social Canada (1992).** Recommandations au sujet de la qualité des eaux utilisées à des fins récréatives au Canada. Ottawa, Groupe de travail fédéral-provincial sur la qualité des eaux à usage récréatif du Comité consultatif fédéral-provincial de l'hygiène du milieu et du travail, Ministre des Approvisionnements et Services Canada, 110 pages.
- Santo Domingo, J. W. et N. J. Ashbolt. (2008).** Fecal pollution of water. Cutler J. Cleveland. Consulté le 10 juillet 2010. http://eearth.org/article/Fecal_pollution_of_water.
- Santo Domingo, J. W. et M. J. Sadowsky, Eds. (2007).** Microbial Source Tracking. Washington, ASM Press, 285 pages.

- Savichtcheva, O., N. Okayama et S. Okabe (2007).** Relationships between *Bacteroides* 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. *Water Research* 41(16): 3615-3628.
- Scherrer, B. (1984).** Biostatistique. Boucherville, Gaetan Morin éditeur ltée, 850 pages.
- Schill, W. B. et M. V. Mathes (2008).** Real-time PCR detection and quantification of nine potential sources of fecal contamination by analysis of mitochondrial cytochrome b targets. *Environmental Science & Technology* 42(14): 5229-5234.
- Scott, T. M., J. B. Rose, T. M. Jenkins, S. R. Farrah et J. Lukasik (2002).** Microbial source tracking: Current methodology and future directions. *Applied and Environmental Microbiology* 68(12): 5796-5803.
- Selvapandiyan, A., K. Stabler, N. A. Ansari, S. Kerby, J. Riemenschneider, P. Salotra, R. Duncan et H. L. Nakhasi (2005).** A novel semiquantitative fluorescence-based multiplex polymerase chain reaction assay for rapid simultaneous detection of bacterial and parasitic pathogens from blood. *Journal of Molecular Diagnostics* 7(2): 268-275.
- Servais, P. et J. Passerat (2009).** Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Science of the Total Environment* 408(2): 365-372.
- Shanks, O. C., E. Atikovic, A. D. Blackwood, J. R. Lu, R. T. Noble, J. S. Domingo, S. Seifring, M. Sivaganesan et R. A. Haugland (2008).** Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology* 74(3): 745-752.
- Shanks, O. C., C. A. Kelty, M. Sivaganesan, M. Varma et R. A. Haugland (2009).** Quantitative PCR for genetic markers of human fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology* 75(17): 5507-5513.
- Shanks, O. C., J. W. Santo Domingo, J. R. Lu, C. A. Kelty et J. E. Graham (2007).** Identification of bacterial DNA markers for the detection of human fecal pollution in water. *Applied and Environmental Microbiology* 73(8): 2416-2422.
- Shendure, J., R. D. Mitra, C. Varma et G. M. Church (2004).** Advanced sequencing technologies: Methods and goals. *Nature Reviews Genetics* 5(5): 335-344.
- Simpson, J. M., S. A. Kocherginskaya, R. I. Aminov, L. T. Skerlos, T. M. Bradley, R. I. Mackie et B. A. White (2002a).** Comparative Microbial Diversity in the Gastrointestinal Tracts of Food Animal Species. *Integrative and Comparative Biology* 42(2): 327-331.
- Simpson, J. M., J. W. Santo Domingo et D. J. Reasoner (2002b).** Microbial source tracking: state of the science. *Environmental Science & Technology* 36(24): 5279-5288.

- Skraber, S., L. Ogorzaly, K. Helmi, A. Maul, L. Hoffmann, H. M. Cauchie et C. Gantzer (2009).** Occurrence and persistence of enteroviruses, noroviruses and F-specific RNA phages in natural wastewater biofilms. *Water Research* 43(19): 4780-4789.
- Smith, R. L. et T. M. Smith (2003).** Elements of Ecology. San Francisco, Benjamin Cummings, 682 pages.
- Somarelli, J. A., J. C. Makarewicz, R. Sia et R. Simon (2007).** Wildlife identified as major source of *Escherichia coli* in agriculturally dominated watersheds by BOX A1R-derived genetic fingerprints. *Journal of Environmental Management* 82(1): 60-65.
- Spierings, G., C. Ockhuijsen, H. Hofstra et J. Tommassen (1993).** Polymerase chain reaction for the specific detection of *Escherichia coli/Shigella*. *Research in Microbiology* 144(7): 557-564.
- Sutlovic, D., M. D. Gojanovic et S. Andelinovic (2007).** Rapid extraction of human DNA containing humic acid. *Croatica Chemica Acta* 80(1): 117-120.
- Tallon, P., B. Magajna, C. Lofranco et K. T. Leung (2005).** Microbial indicators of faecal contamination in water: A current perspective. *Water Air and Soil Pollution* 166(1-4): 139-166.
- Tandukar, M., S. J. Huber, T. Onodera et S. G. Pavlostathis (2009).** Biological chromium(VI) reduction in the cathode of a microbial fuel cell. *Environmental Science & Technology* 43(21): 8159-8165.
- Taylor, R. W. et D. M. Turnbull (2005).** Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics* 6(5): 389-402.
- Teletchea, F., C. Maudet et C. Hanni (2005).** Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology* 23(7): 359-366.
- Thermo Fisher Scientific. (2008).** NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual. Consulté le 4 juin 2010. <http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>.
- Trantakis, I. A., M. Fakis, S. S. Tragoulias, T. K. Christopoulos, P. Persephonis, V. Giannetas et P. Ioannou (2010).** Ultrafast fluorescence dynamics of Sybr Green I/DNA complexes. *Chemical Physics Letters* 485(1-3): 187-190.
- Trochimchuk, T., J. Fotheringham, E. Topp, H. Schraft et K. T. Leung (2003).** A comparison of DNA extraction and purification methods to detect *Escherichia coli* O157 : H7 in cattle manure. *Journal of Microbiological Methods* 54(2): 165-175.

- Tsen, H. Y., C. K. Lin et W. R. Chi (1998).** Development and use of 16S rRNA gene targeted PCR primers for the identification of *Escherichia coli* cells in water. *J Appl Microbiol* 85(3): 554-560.
- USEPA (2005).** Microbial Source Tracking Guide Document. Washington, 131 pages.
- Van Lieshout, E. M. M., W. Van Doesburg et R. Van der Meer (2004).** Real-time PCR of host DNA in feces to study differential exfoliation of colonocytes between rats and humans. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 39(9): 852-857.
- Veltri, K. L., M. Espiritu et G. Singh (1990).** Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. *Journal of Cellular Physiology* 143(1): 160-164.
- Verstappen, J., C. Katsaros, R. Torensma et J. W. V. den Hoff (2009).** A functional model for adult stem cells in epithelial tissues. *Wound Repair and Regeneration* 17(3): 296-305.
- Vitzthum, F., G. Geiger, H. Bisswanger, H. Brunner et J. Bernhagen (1999).** A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Analytical Biochemistry* 276(1): 59-64.
- Walker, J. A., D. A. Hughes, B. A. Anders, J. Shewale, S. K. Sinha et M. A. Batzer (2003).** Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. *Analytical Biochemistry* 316(2): 259-269.
- Walters, S. P., K. M. Yamahara et A. B. Boehm (2009).** Persistence of nucleic acid markers of health-relevant organisms in seawater microcosms: Implications for their use in assessing risk in recreational waters. *Water Research* 43(19): 4929-4939.
- Wang, R. F., W. W. Cao et C. E. Cerniglia (1996).** Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon the 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46(1): 341-343.
- Waring, M. J. (1965).** Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology* 13(1): 269-282.
- Wery, N., C. Monteil, A. M. Pourcher et J. J. Godon (2010).** Human-specific fecal bacteria in wastewater treatment plant effluents. *Water Research* 44(6): 1873-1883.
- Wilkes, G., T. Edge, V. Gannon, C. Jokinen, E. Lyautey, D. Medeiros, N. Neumann, N. Ruecker, E. Topp et D. R. Lapen (2009).** Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. *Water Research* 43(8): 2209-2223.

- Wolffs, P. F., K. Glencross, R. Thibaudeau et M. W. Griffiths (2006).** Direct quantitation and detection of salmonellae in biological samples without enrichment, using two-step filtration and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 3896-3900.
- Xu, W., T. Reuter, Y. Xu, T. W. Alexander, B. Gilroyed, L. Jin, K. Stanford, F. J. Larney et T. A. McAllister (2009).** Use of quantitative and conventional PCR to assess biodegradation of bovine and plant DNA during cattle mortality composting. *Environmental Science & Technology* 43(16): 6248-6255.
- Yamaguchi, A., N. Hashimoto, W. Tsutae, K. Seino, Y. Ebina, T. Tokino, N. Sato et K. Kikuchi (2002a).** Detection of human papillomavirus DNA by PCR/microfluorometry for screening of cervical cancer. *Clinica Chimica Acta* 318(1-2): 41-49.
- Yamaguchi, A., J. A. Nepote, M. Kadivar, Y. Tagami, M. Fukushi, Y. Kikuchi, N. Sato et K. Kikuchia (2002b).** Allele specific PCR with microfluorometry: application to the detection of del F508 mutation in cystic fibrosis. *Clinica Chimica Acta* 316(1-2): 147-154.
- Yates, M. V. (2007).** Classical indicators in the 21st century--far and beyond the coliform. *Water Environment Research* 79(3): 279-286.

ANNEXE A :

Alignement des séquences amplifiées par les amorces consensuelles et spécifiques chez les 14 espèces animales sélectionnées pour le projet de recherche.

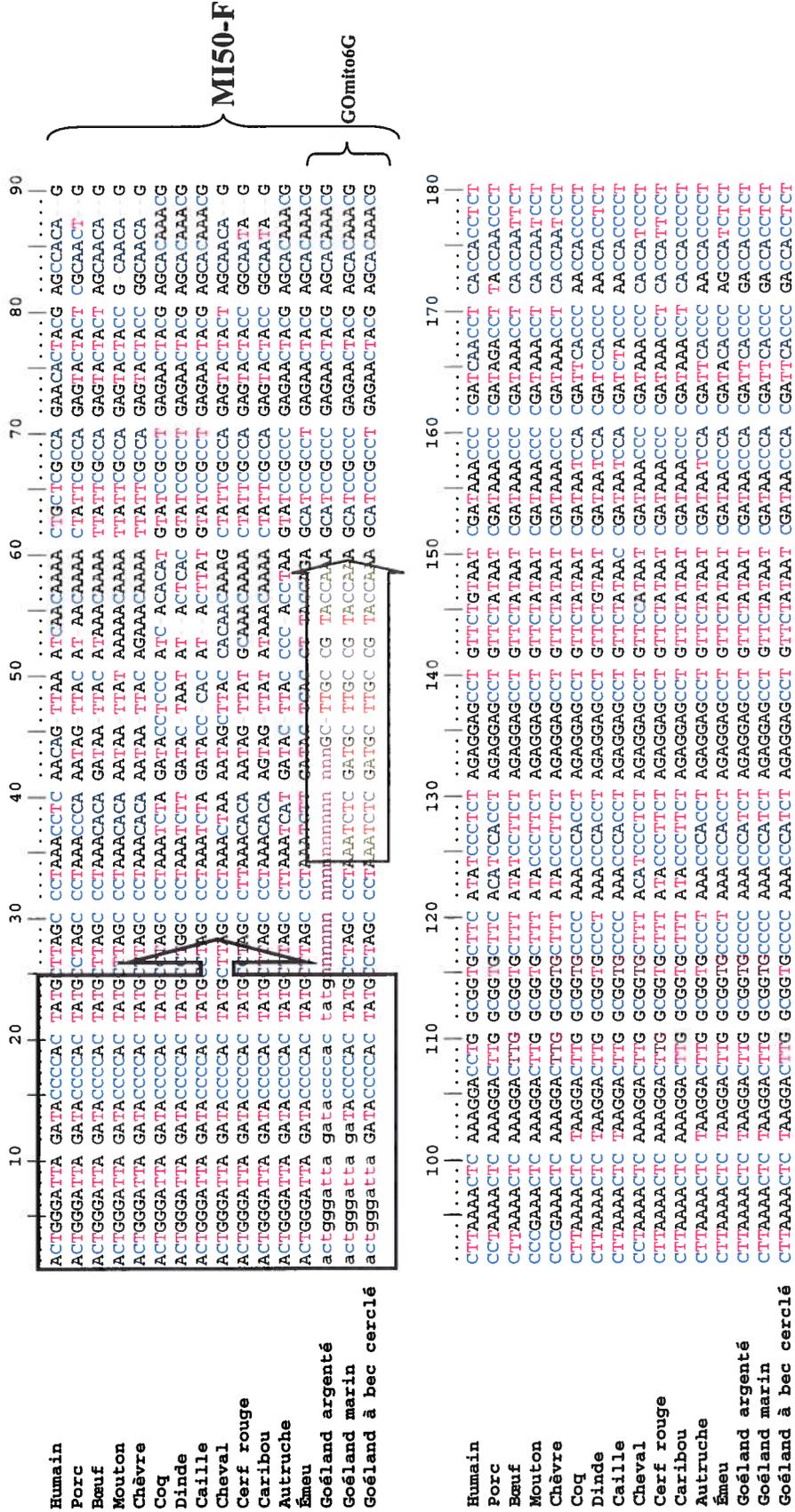


Figure A.1

Alignement des séquences amplifiées par les amorces consensuelles et spécifiques chez les espèces animales sélectionnées.

Les flèches représentent la séquence complémentaire aux amorces dont le nom est indiqué à droite. Le sens de la flèche précise le sens de l'élongation.

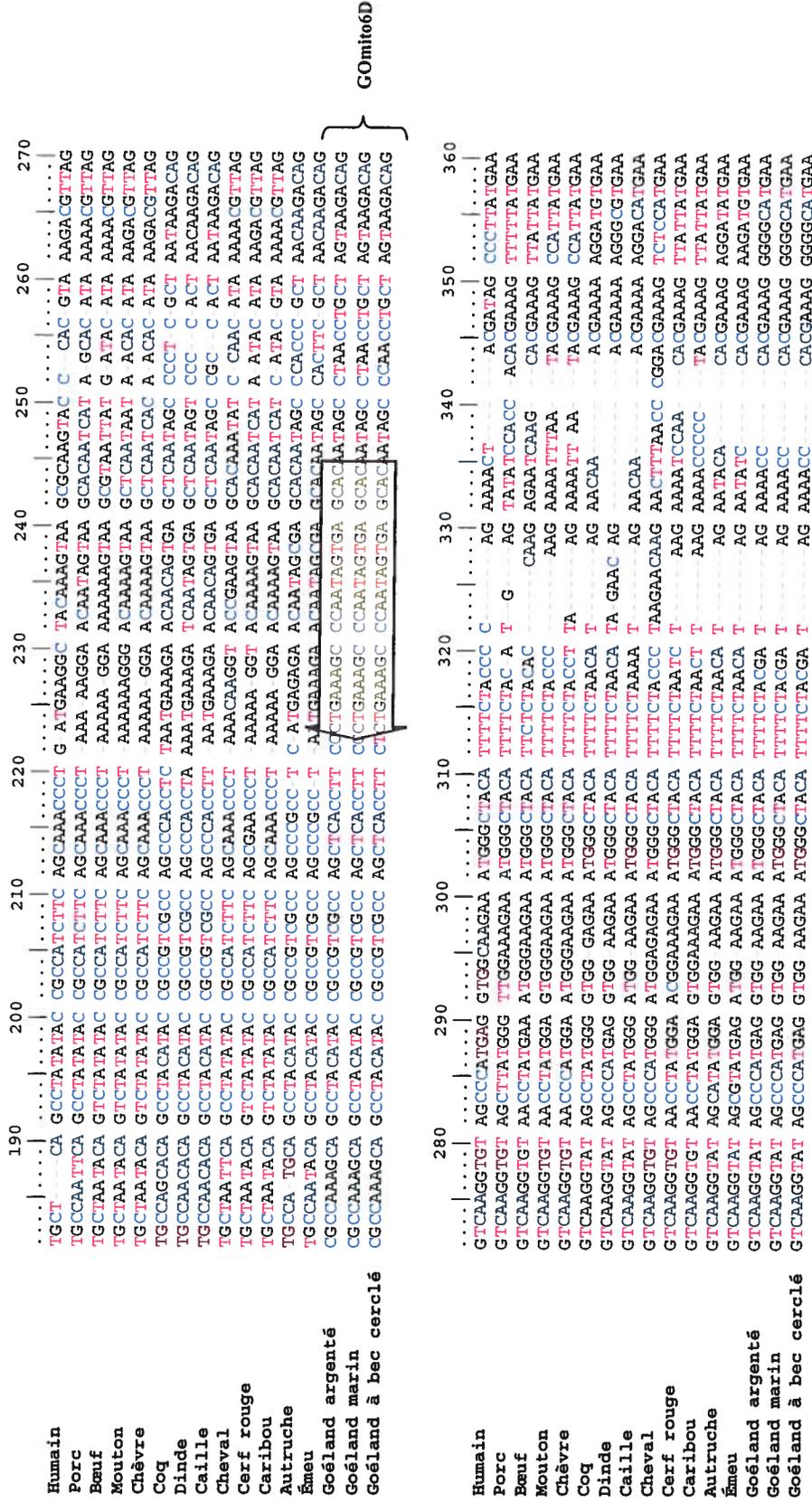


Figure A.1 (suite)
Alignement des séquences amplifiées par les amorces consensuelles et spécifiques chez les espèces animales sélectionnées.
Les flèches représentent la séquence complémentaire aux amorces dont le nom est indiqué à droite. Le sens de la flèche précise le sens de l'élongation.

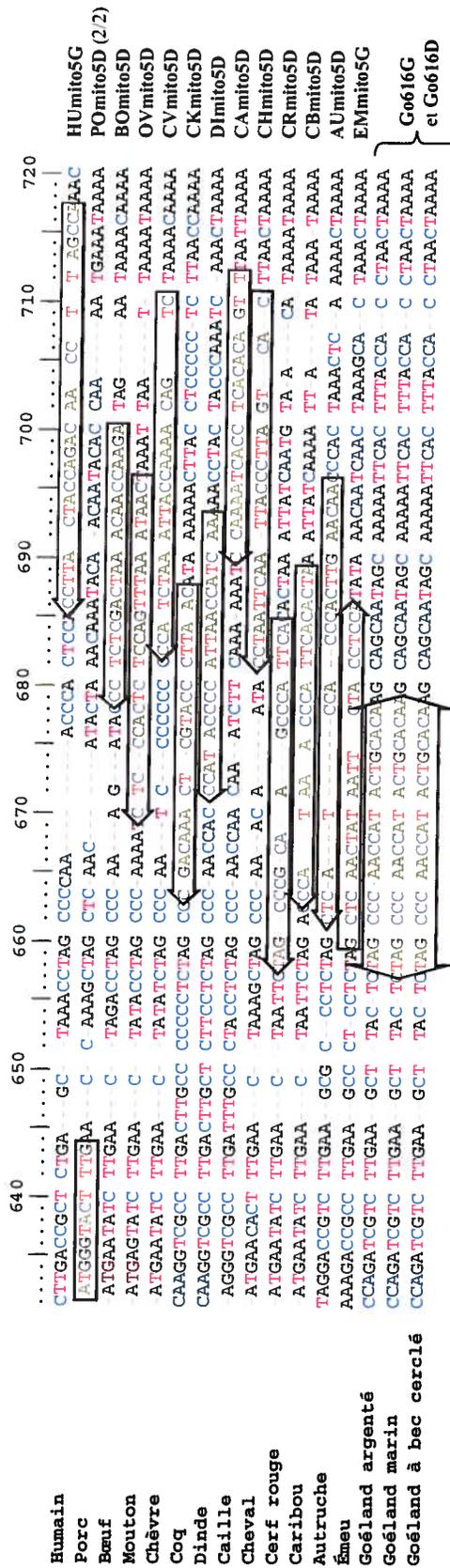
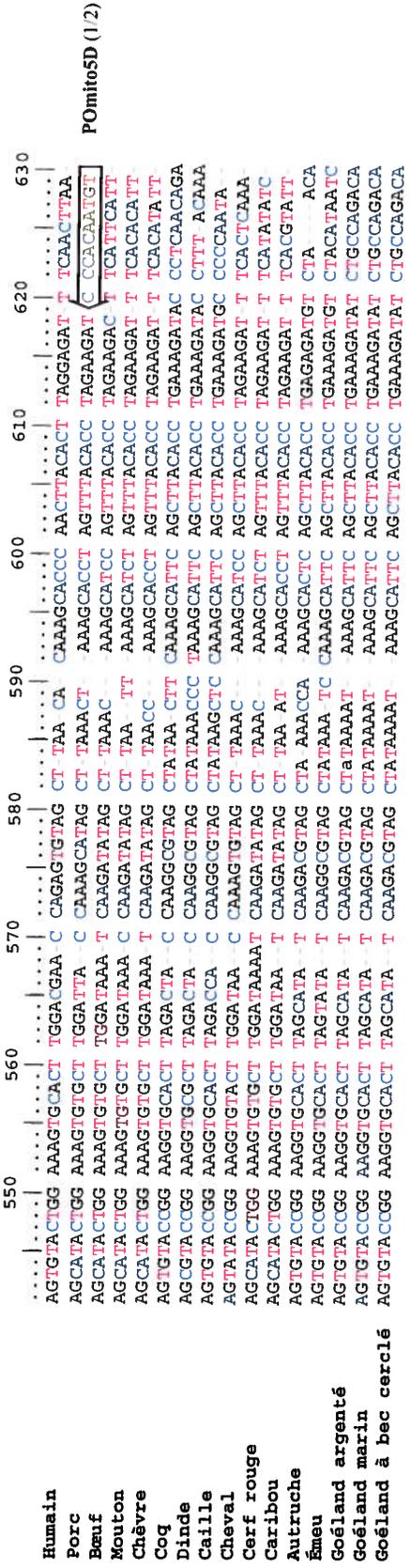


Figure A.1 (suite)
Alignement des séquences amplifiées par les amorces consensuelles et spécifiques chez les espèces animales sélectionnées. Les flèches représentent la séquence complémentaire aux amorces dont le nom est indiqué à droite. Le sens de la flèche précise le sens de l'élongation.

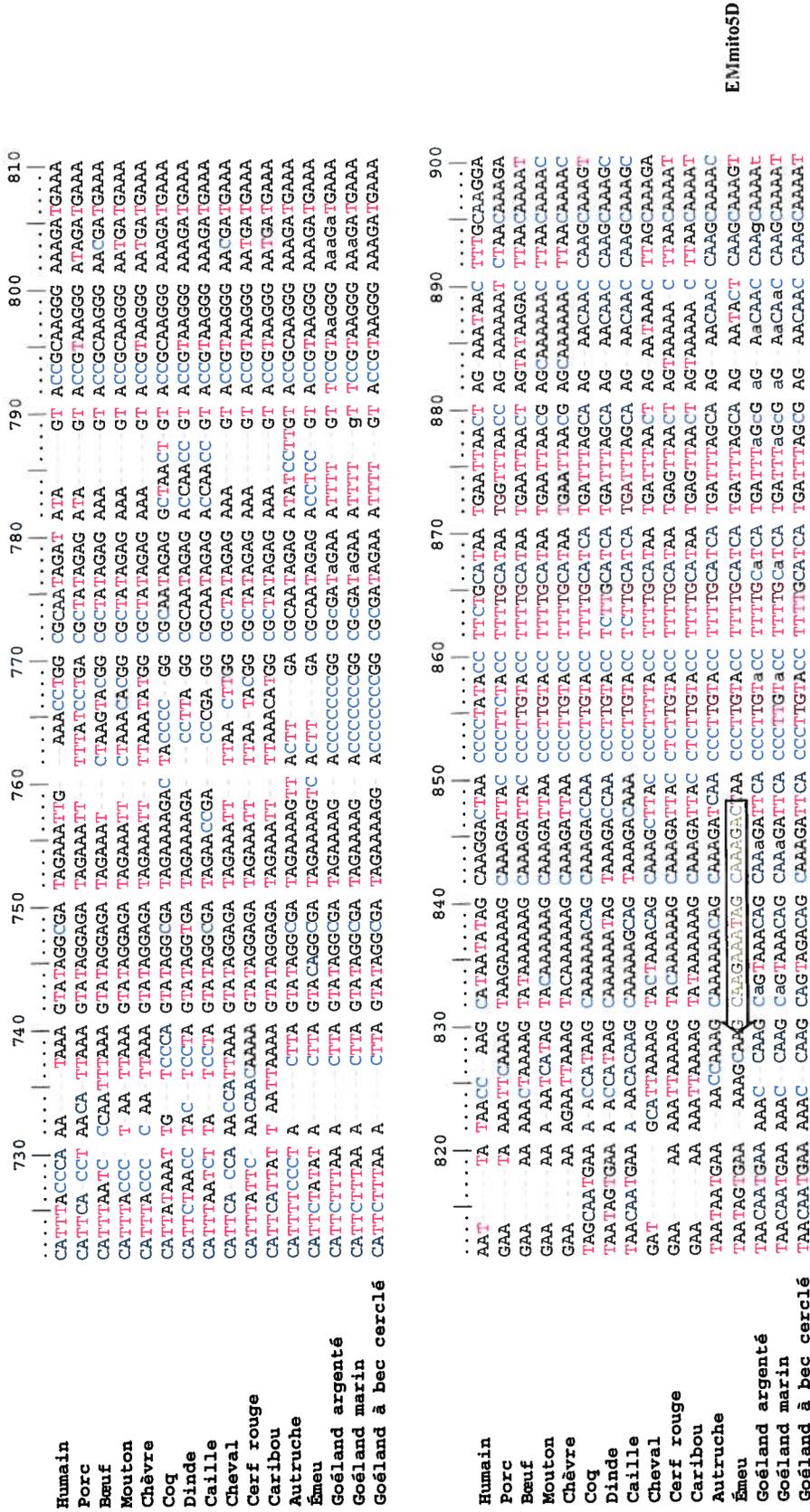


Figure A.1 (suite)
 Alignement des séquences amplifiées par les amorces consensuelles et spécifiques chez les espèces animales sélectionnées.
 Les flèches représentent la séquence complémentaire aux amorces dont le nom est indiqué à droite. Le sens de la flèche précise le sens de l'élongation.

E Mito5D

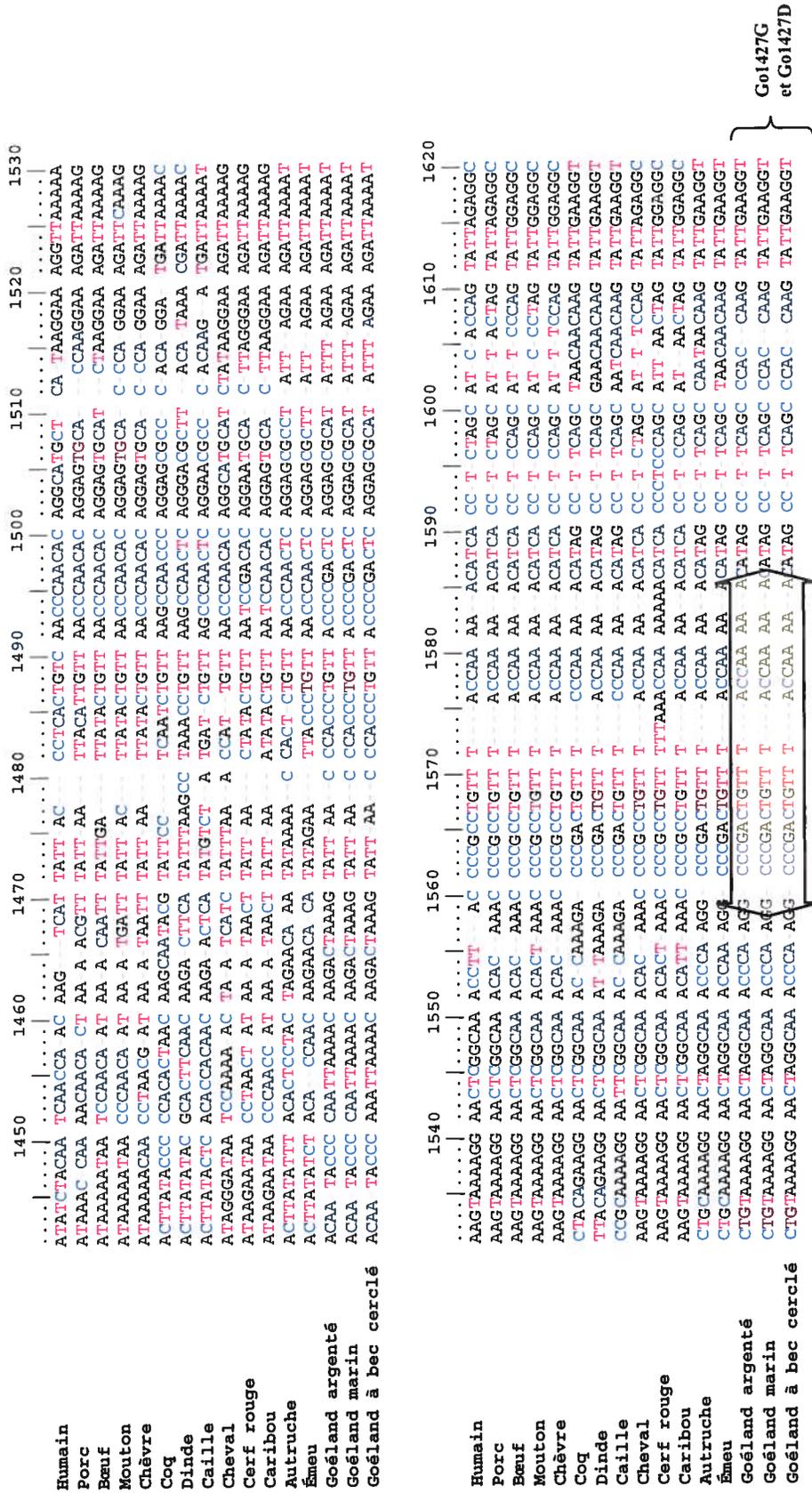


Figure A.1 (suite)
Alignement des séquences amplifiées par les amorces consensuelles et spécifiques chez les espèces animales sélectionnées.
Les flèches représentent la séquence complémentaire aux amorces dont le nom est indiqué à droite. Le sens de la flèche précise le sens de l'élongation.

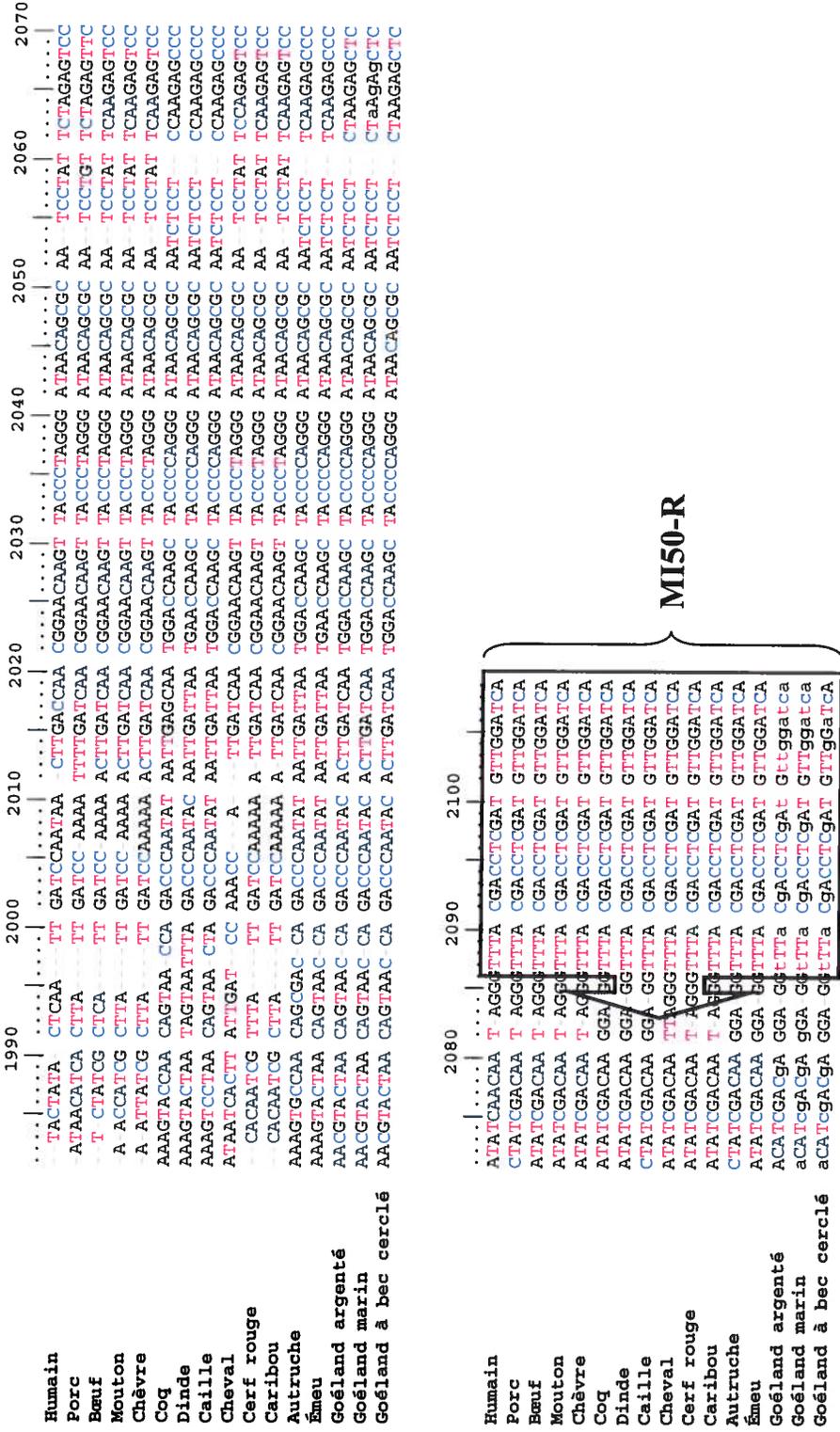


Figure A.1 (suite)
 Alignement des séquences amplifiées par les amorces consensuelles et spécifiques chez les espèces animales sélectionnées.
 Les flèches représentent la séquence complémentaire aux amorces dont le nom est indiqué à droite. Le sens de la flèche précise le sens de l'élongation.

ANNEXE B :

Description des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption et du bassin versant de la rivière South Nation.

Tableau B.I
Photographies aériennes et caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption.

| | |
|---|---|
|  | <p>Numéro du site : #01 Cours d'eau : Rivière l'Achigan Dates d'échantillonnage : 2008 : 09 juin 2009 : 02 octobre Latitude/longitude : 45.8512, -73.7571 Municipalité : Saint-Lin Environnement : Urbain. Commentaires : Aucun</p> |
|  | <p>Numéro du site : #02 Cours d'eau : Rivière l'Achigan Dates d'échantillonnage : 2008 : 09 juin 2009 : 02 octobre Latitude/longitude : 45.8437, -73.7473 Municipalité : Saint-Roch (amont) Environnement : Agricole, écurie et culture du maïs a proximité. Commentaires : Aucun</p> |
|  | <p>Numéro du site : #03 Cours d'eau : Rivière l'Achigan Dates d'échantillonnage : 2008 : 09 juin 2009 : 30 septembre Latitude/longitude : 45.8471, -73.4821 Municipalité : Saint-Roch (aval) Environnement : Urbain. Commentaires : Aucun</p> |
|  | <p>Numéro du site : #04 Cours d'eau : Ruisseau des anges Dates d'échantillonnage : 2008 : 09 juin 2009 : 02 octobre Latitude/longitude : 45.8555, -73.6152 Municipalité : Ruisseau-des-Anges Environnement : Agricole, ferme de bœuf et lamas. Commentaires : Aucun</p> |
|  | <p>Numéro du site : #05 Cours d'eau : Rivière Saint-Esprit Dates d'échantillonnage : 2008 : 11 juin 2009 : 01 octobre Latitude/longitude : 45.9888, -73.7433 Municipalité : Sainte-Julienne (amont) Environnement : Naturel, peu de résidences à proximité. Commentaires : Aucun</p> |

Tableau B.1
Photographies aériennes et caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption.

| | |
|---|--|
|  | <p>Numéro du site : #06 Cours d'eau : Rivière Saint-Esprit Dates d'échantillonnage : 2008 : 11 juin 2009 : 01 octobre Latitude/longitude : 46.01161, -73.7766 Municipalité : Rawdon Environnement : Naturel et urbain. Commentaires : Aucun</p> |
|  | <p>Numéro du site : #07 Cours d'eau : Rivière Saint-Esprit Dates d'échantillonnage : 2008 : 11 juin 2009 : 01 octobre Latitude/longitude : 45.9612, -73.7163 Municipalité : Sainte-Julienne (aval) Environnement : Urbain. Commentaires : Présence de déchets et de gros tuyaux vides.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #08 Cours d'eau : Rivière Saint-Esprit Dates d'échantillonnage : 2008 : 11 juin 2009 : 01 octobre Latitude/longitude : 45.8975, -73.6598 Municipalité : Saint-Esprit (Autoroute 25) Environnement : Urbain et agricole. Commentaires : Écuries à proximité.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #09 Cours d'eau : Ruisseau Vacher Dates d'échantillonnage : 2008 : 10 juin 2009 : 30 septembre Latitude/longitude : 45.9318, -73.5102 Municipalité : Sainte-Marie-Salomé Environnement : Agricole. Commentaires : En amont de l'émissaire municipal.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #10 Cours d'eau : Ruisseau Vacher Dates d'échantillonnage : 2008 : 10 juin 2009 : 30 septembre Latitude/longitude : 45.9232, -73.4306 Municipalité : Saint-Gérard-de-Magella Environnement : Agricole. Commentaires : Aucun</p> |

Tableau B.1
Photographies aériennes et caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la
rivière l'Assomption.

| | |
|---|--|
|  | <p>Numéro du site : #11 Cours d'eau : Rivière l'Assomption Dates d'échantillonnage : 2008 : 10 juin 2009 : 30 septembre Latitude/longitude : 45.9441, -73.4022 Municipalité : Saint-Paul Environnement : Urbain et agricole, élevage de poulet. Commentaires : En aval de l'émissaire municipal.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #12 Cours d'eau : Rivière l'Assomption Dates d'échantillonnage : 2008 : 09 juin 2009 : 30 septembre Latitude/longitude : 45.8050, -73.4338 Municipalité : L'Assomption Environnement : Agricole et urbain. Commentaires : Écuries à proximité.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #13 Cours d'eau : Ruisseau Point-du-jour Dates d'échantillonnage : 2008 : 09 juin 2009 : 30 septembre Latitude/longitude : 45.8493, -73.4088 Municipalité : L'Assomption Environnement : Urbain, agricole. Commentaires : Écurie à proximité</p> |
|  | <p>Numéro du site : #14 Cours d'eau : Rivière Ouareau Dates d'échantillonnage : 2008 : 10 juin 2009 : 30 septembre Latitude/longitude : 45.9531, -73.4265 Municipalité : Saint-Paul Environnement : Agricole, élevage de poulet Commentaires : En aval du barrage</p> |
|  | <p>Numéro du site : #15 Cours d'eau : Ruisseau Saint-Pierre Dates d'échantillonnage : 2008 : 10 juin 2009 : 30 septembre Latitude/longitude : 45.9774, -73.4401 Municipalité : Saint-Paul Environnement : Agricole. Commentaires : Odeur de fumier</p> |

Tableau B.I
Photographies aériennes et caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption.

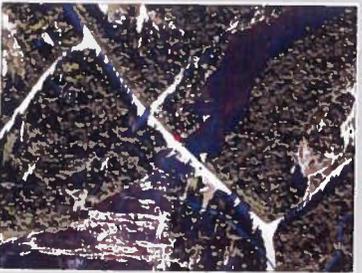
| | |
|---|--|
|  | <p>Numéro du site : #16 Cours d'eau : Rivière Ouareau Dates d'échantillonnage : 2008 : 11 juin 2009 : 01 octobre Latitude/longitude : 46.0335, -73.6891 Municipalité : Rawdon Environnement : Naturel, quelques résidences. Commentaires : En aval de l'émissaire municipal ; station d'épuration par étang aéré.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #17 Cours d'eau : Rivière Ouareau Dates d'échantillonnage : 2008 : 11 juin 2009 : 01 octobre Latitude/longitude : 46.0315, -73.7074 Municipalité : Rawdon (en aval du lac Pontbriand) Environnement : Naturel, quelques résidences. Commentaires : Échantillonnage en aval du pont pour des raisons de sécurité.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #18 Cours d'eau : Rivière Ouareau Dates d'échantillonnage : 2008 : 13 juin 2009 : 01 octobre Latitude/longitude : 46.0537, -73.8154 Municipalité : Rawdon (en amont du lac Pontbriand) Environnement : Naturel, camping à proximité. Commentaires : Aucun</p> |
|  | <p>Numéro du site : #19 Cours d'eau : Bassin du lac Croche et Rivière Ouareau Dates d'échantillonnage : 2008 : 13 juin 2009 : 28 septembre Latitude/longitude : 46.3338, -74.1128 Municipalité : Saint-Donat (en aval) Environnement : Naturel et urbain. Commentaires : Aucun</p> |
|  | <p>Numéro du site : #20 Cours d'eau : Rivière Ouareau Dates d'échantillonnage : 2008 : 13 juin 2009 : 28 septembre Latitude/longitude : 46.3663, -74.2368 Municipalité : Saint-Donat (en amont) Environnement : Naturel, quelques chalets à proximité. Commentaires : En aval d'un barrage.</p> |

Tableau B.1
Photographies aériennes et caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption.

| | |
|---|--|
|  | <p>Numéro du site : #21 Cours d'eau : Rivières Noire et l'Assomption Dates d'échantillonnage : 2008 : 12 juin 2009 : 29 septembre Latitude/longitude : 46.2033, -73.5591 Municipalité : St-Jean de Matha (Parc des chutes) Environnement : Naturel. Commentaires : Échantillonnage au niveau des rapides en amont d'une chute.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #22 Cours d'eau : Rivière l'Assomption Dates d'échantillonnage : 2008 : 12 juin 2009 : 29 septembre Latitude/longitude : 46.1957, -73.5334 Municipalité : Saint-Jean-de-Matha Environnement : Naturel. Commentaires : Aucun</p> |
|  | <p>Numéro du site : #23 Cours d'eau : Rivière l'Assomption Dates d'échantillonnage : 2008 : 10 juin 2009 : 29 septembre Latitude/longitude : 46.0845, -73.5145 Municipalité : Notre-Dame-de-Lourdes Environnement : Naturel et urbain. Commentaires : Aucun</p> |
|  | <p>Numéro du site : #24 Cours d'eau : Rivière Beauport Dates d'échantillonnage : 2008 : 11 juin 2009 : 01 octobre Latitude/longitude : 45.9315, -73.8409 Municipalité : Saint-Calixte (en aval) Environnement : Naturel et urbain. Commentaires : Aucun</p> |
|  | <p>Numéro du site : #25 Cours d'eau : Rivière Beauport Dates d'échantillonnage : 2008 : 11 juin 2009 : 01 octobre Latitude/longitude : 45.9700, -73.8429 Municipalité : Saint-Calixte (en amont) Environnement : Naturel et urbain. Commentaires : Échantillonnage en aval du pont car de la faible profondeur en amont.</p> |

Tableau B.1
Photographies aériennes et caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption.

| | |
|---|---|
|  | <p>Numéro du site : #26 Cours d'eau : Étang de la rivière Ouareau Dates d'échantillonnage : 2008 : 13 juin 2009 : 28 septembre Latitude/longitude : 46.3236, -74.2102 Municipalité : Saint-Donat (aval émissaire municipal) Environnement : Urbain. Commentaires : Beaucoup de matières organiques.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #27 Cours d'eau : Rivière Noire Dates d'échantillonnage : 2008 : 12 juin 2009 : 29 septembre Latitude/longitude : 46.3251, -73.6252 Municipalité : Sainte-Émilie-de-l'Énergie Environnement : Naturel et urbain. Commentaires : En amont de l'émissaire municipal.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #28 Cours d'eau : Rivière Noire Dates d'échantillonnage : 2008 : 12 juin 2009 : 29 septembre Latitude/longitude : 46.3071, -73.5572 Municipalité : Sainte-Émilie-de-l'Énergie Environnement : Urbain. Commentaires : En aval de l'émissaire municipal.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #29 Cours d'eau : Ruisseau de la Baie Dates d'échantillonnage : 2008 : 12 juin 2009 : 29 septembre Latitude/longitude : 46.2220, -73.5227 Municipalité : Saint-Jean-de-Matha Environnement : Urbain, agricole. Commentaires : En amont de l'émissaire municipal.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #30 Cours d'eau : Ruisseau de la Baie Dates d'échantillonnage : 2008 : 12 juin 2009 : 29 septembre Latitude/longitude : 46.2024, -73.5341 Municipalité : Saint-Jean-de-Matha Environnement : Naturel et urbain. Commentaires : En aval de l'émissaire municipal.</p> |

Tableau B.1
Photographies aériennes et caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption.

| | |
|---|--|
|  | <p>Numéro du site : #31 Cours d'eau : Cours d'eau Jolimont Dates d'échantillonnage : 2008 : 12 juin 2009 : 29 septembre Latitude/longitude : 46.1966, -73.6202 Municipalité : Ste-Béatrix Environnement : Urbain Commentaires : Aucun</p> |
|  | <p>Numéro du site : #32 Cours d'eau : Cours d'eau Jolimont Dates d'échantillonnage : 2008 : 12 juin 2009 : 29 septembre Latitude/longitude : 46.2180, -73.5754 Municipalité : Sainte-Béatrix Environnement : Naturel et urbain. Commentaires : En aval de l'émissaire municipal.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #33 Cours d'eau : Le Grand Ruisseau Dates d'échantillonnage : 2008 : 10 juin 2009 : 28 septembre Latitude/longitude : 46.0829, -73.5455 Municipalité : St- Ambroise Environnement : Agricole. Commentaires : Aucun</p> |
|  | <p>Numéro du site : #34 Cours d'eau : Le Grand Ruisseau Dates d'échantillonnage : 2008 : 10 juin 2009 : 28 septembre Latitude/longitude : 46.0731, -73.5452 Municipalité : St-Ambroise Environnement : Agricole. Commentaires : Eau chargée en sédiments. Odeur de fumier.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #35 Cours d'eau : Rivière l'Assomption Dates d'échantillonnage : 2008 : 12 juin 2009 : 28 septembre Latitude/longitude : 46.2862, -73.7944 Municipalité : Saint-Côme (en amont) Environnement : Naturel, camping à proximité. Commentaires : Selon un résident: «Niveau de la rivière le plus bas depuis 40 ans. »</p> |

Tableau B.I
Photographies aériennes et caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption.

| | |
|---|---|
|  | <p>Numéro du site : #36 Cours d'eau : Rivière l'Assomption Dates d'échantillonnage : 2008 : 12 juin 2009 : 28 septembre Latitude/longitude : 46.2376, -73.7248 Municipalité : Saint-Côme (en aval) Environnement : Urbain et naturel. Commentaires : Aucun</p> |
|  | <p>Numéro du site : #37 Cours d'eau : Rivière Jourdain Dates d'échantillonnage : 2008 : 09 juin 2009 : 02 octobre Latitude/longitude : 45.8168, -73.9030 Municipalité : Sainte-Sophie Environnement : Agricole et urbain. Commentaires : En amont de l'émissaire municipal.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #38 Cours d'eau : Rivière Jourdain Dates d'échantillonnage : 2008 : 09 juin 2009 : 02 octobre Latitude/longitude : 45.8070, -73.8896 Municipalité : Sainte-Sophie Environnement : Agricole. Commentaires : En aval de l'émissaire municipal.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #39 Cours d'eau : Rivière Burton Dates d'échantillonnage : 2008 : 13 juin 2009 : 01 octobre Latitude/longitude : 46.0669, -73.8853 Municipalité : Chertsey Environnement : Urbain, boisé. Commentaires : En amont de l'émissaire municipal.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #40 Cours d'eau : Rivière Burton Dates d'échantillonnage : 2008 : 13 juin 2009 : 01 octobre Latitude/longitude : 46.0691, -73.8847 Municipalité : Chertsey Environnement : Urbain. Commentaires : En aval de l'émissaire municipal.</p> |

Tableau B.I
Photographies aériennes et caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption.

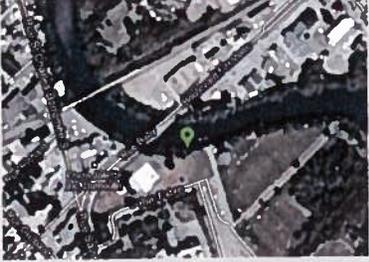
| | |
|---|--|
|  | <p>Numéro du site : #41 Cours d'eau : Cours d'eau Martial-Perreault Dates d'échantillonnage : 2008 : 10 juin 2009 : 29 septembre Latitude/longitude : 46.1169, -73.5142 Municipalité : Sainte-Mélanie Environnement : Agricole. Commentaires : En aval de l'émissaire municipal et d'un ponceau.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #42 Cours d'eau : Rivière Saint-Esprit Dates d'échantillonnage : 2008 : 11 juin 2009 : 01 octobre Latitude/longitude : 45.9310, -73.6332 Municipalité : Saint-Alexis Environnement : Agricole Commentaires : En amont de l'émissaire municipal.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #43 Cours d'eau : Rivière Saint-Esprit Dates d'échantillonnage : 2008 : 11 juin 2009 : 01 octobre Latitude/longitude : 45.9016, -73.6089 Municipalité : Saint-Alexis Environnement : Agricole Commentaires : En aval de l'émissaire municipal. Odeur de fumier.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #45 Cours d'eau : Rivière l'Achigan Dates d'échantillonnage : 2008 : 09 juin 2009 : 30 septembre Latitude/longitude : 45.8486, -73.4485 Municipalité : L'Épiphanie Environnement : Agricole et urbain. Commentaires : En aval de l'émissaire municipal.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #46 Cours d'eau : Rivière l'Achigan Dates d'échantillonnage : 2008 : 09 juin 2009 : 30 septembre Latitude/longitude : 45.8595, -73.4613 Municipalité : L'Épiphanie Environnement : Agricole. Commentaires : À l'embouchure de la rivière Saint-Esprit.</p> |

Tableau B.I

Photographies aériennes et caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption.

| | |
|---|---|
|  | <p>Numéro du site : #47 Cours d'eau : Rivière l'Assomption Dates d'échantillonnage : 2008 : 10 juin 2009 : 30 septembre Latitude/longitude : 45.9274, -73.5400 Municipalité : Saint-Jacques Environnement : Agricole. Commentaires : En aval de l'émissaire municipal.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #48 Cours d'eau : Rivière l'Assomption Dates d'échantillonnage : 2008 : 10 juin 2009 : 30 septembre Latitude/longitude : 45.9447, -73.5561 Municipalité : Saint-Jacques Environnement : Agricole et urbain. Commentaires : En amont de l'émissaire municipal.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #49 Cours d'eau : Rivière Saint-Esprit Dates d'échantillonnage : 2008 : 11 juin 2009 : 01 octobre Latitude/longitude : 45.9143, -73.6906 Municipalité : Saint-Esprit Environnement : Agricole et urbain. Commentaires : En amont de l'émissaire municipal.</p> |
|  | <p>Numéro du site : #50 Cours d'eau : Rivière l'Assomption Dates d'échantillonnage : 2008 : 09 juin 2009 : 30 septembre Latitude/longitude : 45.7172, -73.4822 Municipalité : Charlemagne et Repentigny Environnement : Urbain. Commentaires : Aucun</p> |
|  | <p>Numéro du site : #51 Cours d'eau : Rivière rouge Date d'échantillonnage : 2009 : 02 octobre Latitude/longitude : 45.9719, -73.4881 Municipalité : Crabtree Environnement : Urbain, boisé et agricole. Commentaires : Aucun</p> |

Tableau B.1
Photographies aériennes et caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière l'Assomption.

| | | |
|---|---------------------------------|--|
|  | Numéro du site : | #52 |
| | Cours d'eau : | Rivière l'Assomption |
| | Date d'échantillonnage : | 2009 : 02 octobre |
| | Latitude/longitude : | 46.0304,-73.4366 |
| | Municipalité : | Joliette |
| | Environnement : | Urbain |
| | Commentaires | Derrière les bureaux de la Corporation d'aménagement de la rivière l'Assomption. |

Les photos satellite de toutes les stations sauf 37, 38, 51 et 52 ont été fournies par la Corporation de l'aménagement de la rivière l'Assomption. Les photos satellite des stations 37, 38, 51 et 52 proviennent du programme *Google Maps* (<http://maps.google.ca>). Les coordonnées de GPS ont été converties en coordonnées de degrés décimales par le programme *GPS Latitude / Longitude Coordinate Converter* (<http://www.csgnetwork.com/gpscoordconv.html>).

Tableau B.II
Caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière South Nation.

| | |
|------------------------------------|---|
| Numéro du site : | #01 |
| Cours d'eau : | Rivière South Nation |
| Dates d'échantillonnage : | 2005 : 26 juillet; 01 septembre. |
| Localisation : | Prise d'eau de la communauté de Casselman. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (4 %), agriculture (38 %), urbain (1 %), naturel (15 %). |
| Commentaires : | Le drainage de la région sud de Casselman se trouvait à environ 1,7 km en amont du site d'échantillonnage. |
| | |
| Numéro du site : | #02 |
| Cours d'eau : | Rivière South Nation |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 04 août ; 03 décembre. 2005 : 13 et 15 juin ; 22 août ; 03 octobre. |
| Localisation : | Route de compté numéro 3. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (4 %), agriculture (38 %), urbain (1 %), naturel (15 %). |
| Commentaires : | Pour des raisons de proximité, ce site recevait plus d'écoulement de surface provenant de la région nord de Casselman. La bande tampon était minimale le long de la rivière South Nation. |
| | |
| Numéro du site : | #03 |
| Cours d'eau : | Fossé de drainage rural |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 05 avril; 11 août; 03 novembre. 2005 : 25 avril; 01 septembre; 17 octobre. 2006 : 16 août. |
| Localisation : | Route Faucher. |
| Aménagement du territoire : | Agriculture (17 %), urbain (2 %), naturel (27 %). |
| Commentaires : | Les échantillons ont été récoltés au bord de la tranchée de drainage. Le site était adjacent à une autoroute de quatre voies. Des productions laitières étaient situées à environ 1,8 et 2,4 km en amont du site. |
| | |
| Numéro du site : | #04 |
| Cours d'eau : | Rivière Castor |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 15 juillet. 2005 : 15 juin ; 06 août ; 03 septembre ; 30 novembre. 2006 : 12 juin. |
| Localisation : | Route de compté numéro 5. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (2 %), agriculture (41 %), urbain (8 %), naturel (13 %). |
| Commentaires : | Les berges étaient relativement escarpées, limitant l'accès des animaux à la rivière. Un site de production et d'élevage laitier occupait la rive sud. La végétation formait une bande tampon tout le long de la rivière et de ses tributaires. Le système routier et le développement urbain à proximité du site ne fournissaient pas un accès favorable à la rivière pour la faune sauvage. Un bassin de stabilisation des eaux usées était situé à 12 km en amont. Observation d'épandage de fertilisant solide. |

Tableau B.II
Caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière South Nation.

| | |
|------------------------------------|--|
| Numéro du site : | #05 |
| Cours d'eau : | Rivière Little Castor |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 03 mai. 2005 : 25 avril; 15 juin; 26 juillet; 01 septembre; 30 novembre. |
| Localisation : | Route de compté numéro 5. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (2 %), agriculture (46 %), naturel (11 %). |
| Commentaires : | Des productions laitières étaient situées à environ 70 et 200 m en amont du site. La majorité de la berge présentait une bande tampon de végétation. Un bassin de stabilisation des eaux usées était situé à proximité. Près du site, la pente de la berge était inférieure à la moyenne. |
| | |
| Numéro du site : | #06 |
| Cours d'eau : | Rivière Payne |
| Dates d'échantillonnage : | 2005 : 25 avril ; 30 novembre. 2006 : 27 juin. |
| Localisation : | Route de compté numéro 13. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (5 %), agriculture (32 %), urbain (1 %), naturel (23 %). |
| Commentaires : | La berge présentait une portion significative de prés et d'arbustes. Plusieurs productions laitières étaient situées à environ 800 m à l'ouest du site. L'épandage de fumier solide a été observé à plusieurs endroits adjacents aux tributaires de la rivière. Les berges situées près du site étaient basses. |
| | |
| Numéro du site : | #07 |
| Cours d'eau : | Rivière South Nation |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 09 septembre. |
| Localisation : | Municipalité de Chrysler, Route de compté numéro 9. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (5 %), agriculture (48 %), naturel (10 %). |
| Commentaires : | L'échantillonnage a été récolté à partir d'un pont. Le développement urbain était élevé mais devenait brusquement agricole quelques kilomètres en amont. La bande tampon rivulaire était limitée près du site. Des productions laitières étaient situées à 1,5 km (non riveraine) et 3 km (riveraine) en amont. |
| | |
| Numéro du site : | #08 |
| Cours d'eau : | Rivière South Nation |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 30 novembre. 2005 : 11 juillet ; 08 et 22 août. |
| Localisation : | Municipalité de St-Albert, Route de compté numéro 7. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (4 %), agriculture (37 %), urbain (1 %), naturel (18 %). |
| Commentaires : | L'échantillon a été récolté à partir d'un pont. Un bassin de stabilisation des eaux usées était situé à 2,6 km en amont. Une petite bande tampon rivulaire était présente. La communauté de Chrysler située environ 4,7 km en amont représentait une source potentielle de contamination fécale en raison de systèmes septiques défectueux et des déchets urbains solides qui y sont associés. |

Tableau B.II
Caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière South Nation.

| | |
|------------------------------------|--|
| Numéro du site : | #09 |
| Cours d'eau : | Ruisseau Butternut |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 15 juillet ; 11 et 16 août ; 09 septembre ; 03 novembre. 2005 : 15 juin ; 26 juillet ; 01 et 27 septembre. 2006 : 27 juin ; 16 août. |
| Localisation : | Route 800. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (4 %), agriculture (36 %), naturel (19 %). |
| Commentaires : | Des activités de pâturage et de fourrage étaient adjacentes au cours d'eau. De larges zones de terres humides étaient situées dans un rayon de 2 km. Peu de végétation était présente au niveau du site. Huit productions laitières et une de poulet étaient installées dans un rayon de 2,5 km. La pente de la berge était généralement basse en amont. Des épandages de fumier solide et liquide ont été observés respectivement près du site et plus loin en amont. |
| | |
| Numéro du site : | #10 |
| Cours d'eau : | Ruisseau Butternut |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 03 novembre. 2005 : 13 juin ; 26 juillet ; 27 septembre. 2006 : 15 mai ; 12 et 28 juin ; 24 et 27 juillet. |
| Localisation : | Route St-Isidore. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (4 %), agriculture (38 %), urbain (1 %), naturel (15 %). |
| Commentaires : | L'échantillon a été récolté à partir d'un pont à proximité de la « outlet » de la rivière South Nation. Une production laitière avec accès du bétail était située immédiatement en amont du site. Un terrain de golf était situé à plusieurs centaines de mètres du site. Le développement urbain du bassin représentait une source potentielle d'eaux usées. |
| | |
| Numéro du site : | #11 |
| Cours d'eau : | Rivière South Nation |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 03 décembre. 2005 : 25 avril ; 26 juillet ; 08 août ; 01 et 06 septembre. |
| Localisation : | Route St-Isidore. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (4 %), agriculture (39 %), urbain (1 %), naturel (15 %). |
| Commentaires : | Des productions laitières et des zones de pâturage étaient présentes sur les rives proches ou en amont du site. Le cours d'eau était bordé de terres cultivées et de fourrages et la pente de la berge était relativement basse. |
| | |
| Numéro du site : | #12 |
| Cours d'eau : | Rivière Little Castor |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 30 novembre ; 03 décembre. 2005 : 25 avril ; 30 novembre. |
| Localisation : | Route Burelle. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (3 %), agriculture (46 %), naturel (11 %). |
| Commentaires : | La pente de la berge était relativement élevée et bordée de végétation naturelle. Un bassin de stabilisation des eaux usées municipales et un terrain de caravanning étaient respectivement situés à 8 km et 6,5 km en amont. Des réseaux de drainage en tuiles étaient situés le long de la rive immédiatement en amont du site. |

Tableau B.II
Caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière South Nation.

| | |
|------------------------------------|---|
| Numéro du site : | #13 |
| Cours d'eau : | Rivière Little Castor |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 14 avril ; 15 juillet ; 30 novembre. 2005 : 25 avril ; 30 novembre. |
| Localisation : | Route Longtin |
| Aménagement du territoire : | Élevage (3 %), agriculture (44 %), naturel (11 %). |
| Commentaires : | La berge était similaire à celle du site numéro 12 mais présentait une bande tampon rivulaire moins dense. Six productions laitières étaient situées à moins de 2 km en amont. L'application de fumiers liquides et solides ont été observés en amont. |
| Numéro du site : | #14 |
| Cours d'eau : | Rivière Little Castor |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 15 juillet. 2005 : 15 juin. 2006 : 12 et 27 juin ; 16 août. |
| Localisation : | Route de compté numéro 5. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (9 %), agriculture (36 %), urbain (1 %), naturel (5 %). |
| Commentaires : | Aucun |
| Numéro du site : | #15 |
| Cours d'eau : | Fossé de drainage rural (Tributaire de 500 hectares) |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 09 septembre. 2005 : 15 juin ; 14 juillet ; 30 août ; 01 et 27 septembre. 2006 : 08 et 16 août. |
| Localisation : | Non précisé. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (3 %), agriculture (54 %). |
| Commentaires : | L'échantillonnage a été fait en bordure d'un fossé de drainage. Le territoire du site était un pré ouvert qui devenait graduellement boisé avec accès du bétail au cours d'eau. Les terres cultivées, les pâturages et les fourrages situés en amont du site recevaient des applications de fumier au printemps et à l'automne. |
| Numéro du site : | #16 |
| Cours d'eau : | Rivière Castor |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 30 novembre ; 03 décembre. 2005 : 06 et 27 septembre ; 17 octobre ; 30 novembre. |
| Localisation : | Route 600. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (2 %), agriculture (28 %), urbain (3 %), naturel (19 %). |
| Commentaires : | Aucun |
| Numéro du site : | #17 |
| Cours d'eau : | Rivière South Nation |
| Dates d'échantillonnage : | 2004 : 03 décembre. 2005 : 11 juillet ; 01 septembre ; 30 novembre. |
| Localisation : | Route 700. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (4 %), agriculture (38 %), urbain (1 %), naturel (16 %). |
| Commentaires : | Aucun |

Tableau B.II
Caractéristiques des sites d'échantillonnage du bassin versant de la rivière South Nation.

| | |
|------------------------------------|--|
| Numéro du site : | #18 |
| Cours d'eau : | Drain Blanchard |
| Dates d'échantillonnage : | 2005 : 18 avril ; 15 juin ; 30 août ; 17 octobre. 2006 : 27 juin ; 27 juillet ; 16 août. |
| Municipalité : | Route 700. |
| Aménagement du territoire : | Agriculture (56 %). |
| Commentaires : | Aucun |
| | |
| Numéro du site : | #19 |
| Cours d'eau : | Drain Blanchard |
| Dates d'échantillonnage : | 2005 : 18 et 25 avril ; 15 juin ; 30 août ; 19 et 27 septembre ; 03 octobre. 2006 : 24 juillet. |
| Localisation : | Route Lafleche. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (1 %), agriculture (70 %). |
| Commentaires : | Aucun |
| | |
| Numéro du site : | #20 |
| Cours d'eau : | Drain Bisaillon |
| Dates d'échantillonnage : | 2005 : 11 et 18 avril ; 15 juin ; 30 août ; -01 et 06 septembre. |
| Localisation : | Route Guerin. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (2 %), agriculture (53 %), naturel (13 %). |
| Commentaires : | Aucun |
| | |
| Numéro du site : | #21 |
| Cours d'eau : | Drain Bisaillon |
| Dates d'échantillonnage : | 2005 : 15 et 28 juin ; 30 août. 2006 : 27 juillet ; 08 août. |
| Localisation : | Route Lafleche. |
| Aménagement du territoire : | Élevage (3 %), agriculture (56 %), naturel (14 %). |
| Commentaires : | Aucun |
| | |
| Numéro du site : | #22 |
| Cours d'eau : | Accès restreint du bétail (Restricted Cattle Access) |
| Dates d'échantillonnage : | 2005 : 15 juin ; 19 et 27 septembre ; 03 octobre. 2006 : 16 août. |
| Localisation : | Non précisé. |
| Aménagement du territoire : | Agriculture (55 %). |
| Commentaires : | Aucun |
| | |
| Numéro du site : | #23 |
| Cours d'eau : | Accès non restreint du bétail (Unrestricted Cattle Access) |
| Dates d'échantillonnage : | 2006 : 24 juillet ; 16 août. |
| Localisation : | Non précisé. |
| Aménagement du territoire : | Non précisé. |
| Commentaires : | Aucun |

Les informations concernant l'aménagement du territoire et les commentaires ont été récoltées dans la littérature (Lyautey et al. 2007; Ruecker et al. 2007).

ANNEXE C :

Volume filtré et turbidité des échantillons récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption, passage sur PVPP et spectrophotométrie des produits d'extraction d'ADN.

Tableau C.III
Volume filtré et turbidité des échantillons récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption.

| Numéro de station | Turbidité (UTN) | Volume filtré (ml) | | | |
|-------------------|-----------------|--------------------|--------|--------|--------|
| | | 2009 | 2008-A | 2008-B | 2009-A |
| 01 | 8,73 | 200* | 200* | 500 | 550 |
| 02 | 7,47 | 190* | 190* | 400 | 450 |
| 03 | 8,23 | 200* | 200* | 450 | 500 |
| 04 | 21,10 | 100* | 100* | 300 | 350 |
| 05 | 2,21 | 300 | 300 | 500 | 570 |
| 06 | 3,74 | 300 | 300 | 500 | 500 |
| 07 | 2,51 | 350 | 350 | 500 | 560 |
| 08 | 4,71 | 350 | 350 | 370 | 300 |
| 09 | 17,90 | 300 | 300 | 400 | 450 |
| 10 | 40,30 | 300 | 300 | 220 | 300 |
| 11 | 8,14 | 250 | 150 | 400 | 450 |
| 12 | 15,60 | 180* | 180* | 400 | 450 |
| 13 | 60,30 | 100* | 100* | 230 | 200 |
| 14 | 5,97 | 200* | 200* | 500 | 610 |
| 15 | 29,60 | 150* | 150* | 300 | 300 |
| 16 | 1,45 | 350 | 350 | 500 | 600 |
| 17 | 1,53 | 350 | 350 | 500 | 500 |
| 18 | 0,85 | 300 | 300 | 500 | 620 |
| 19 | 0,63 | 300 | 300 | 500 | 475 |
| 20 | 1,25 | 300 | 300 | 550 | 560 |
| 21 | 1,20 | 300 | 300 | 500 | 560 |
| 22 | 3,00 | 300 | 300 | 500 | 450 |
| 23 | 3,86 | 250* | 250* | 500 | 600 |
| 24 | 1,56 | 350 | 350 | 400 | 300 |
| 25 | 1,17 | 350 | 350 | 500 | 520 |
| 26 | 9,05 | 296 | 299 | 400 | 400 |
| 27 | 2,30 | 300 | 300 | 400 | 450 |
| 28 | 2,00 | 300 | 300 | 400 | 500 |
| 29 | 38,50 | 300 | 300 | 400 | 400 |
| 30 | 7,51 | 300 | 300 | 400 | 400 |
| 31 | 1,65 | 300 | 300 | 550 | 550 |
| 32 | 1,64 | 300 | 300 | 550 | 550 |
| 33 | 10,40 | 150* | 150* | 400 | 590 |
| 34 | 42,70 | 100* | 100* | 150 | 150 |
| 35 | 0,80 | 300 | 300 | 500 | 450 |
| 36 | 1,34 | 300 | 300 | 600 | 400 |
| 37 | 9,54 | 180* | 180* | 350 | 400 |
| 38 | 8,80 | 125* | 100* | 350 | 350 |
| 39 | 1,66 | 300 | 300 | 500 | 300 |
| 40 | 1,75 | 300 | 300 | 350 | 350 |
| 41 | 22,60 | 300 | 300 | 400 | 450 |
| 42 | 10,30 | 350 | 350 | 400 | 300 |
| 43 | 7,66 | 350 | 350 | 400 | 300 |
| 45 | 11,10 | 200* | 400* | 450 | 450 |
| 46 | 15,50 | 160* | 160* | 350 | 400 |
| 47 | 19,00 | 200* | 200* | 405 | 300 |
| 48 | 135,00 | 250* | 250* | 150 | 150 |
| 49 | 4,24 | 350 | 350 | 550 | 500 |
| 50 | 12,50 | 150* | 200* | 250 | 400 |
| 51 | 28,30 | 0 | 0 | 350 | 200 |
| 52 | 3,90 | 0 | 0 | 550 | 490 |
| Moyenne | 13,00 | 251 | 253 | 421 | 430 |

(*) Les volumes marqués d'un astérisque ont été filtrés sur une membrane de porosité 0,22 µm.

Tableau C.IV
Spectrophotométrie de l'ADN total extrait des échantillons d'eau de surface récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption en juin 2008 (série de filtrations A).

| Échantillon | Passages sur PVPP | Concentration d'ADN (ng/µl) | A ₃₄₀ finale | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ |
|----------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 01-2008-A | 1 | 21,90 | 0,079 | 0,88 | 1,39 |
| 02-2008-A | 1 | 34,62 | 0,106 | 0,89 | 1,35 |
| 03-2008-A | 1 | 34,16 | 0,093 | 0,88 | 1,43 |
| 04-2008-A | 1 | 28,17 | 0,179 | 0,60 | 1,57 |
| 05-2008-A | 1 | 21,92 | 0,054 | 0,52 | 1,32 |
| 06-2008-A | 1 | 17,73 | 0,052 | 0,86 | 1,32 |
| 07-2008-A | 2 | 23,15 | 0,063 | 0,89 | 1,67 |
| 08-2008-A | 2 | 26,48 | 0,041 | 0,85 | 1,79 |
| 09-2008-A | 1 | 23,29 | 0,002 | 0,89 | 1,74 |
| 10-2008-A | 2 | 27,48 | 0,020 | 0,79 | 1,78 |
| 11-2008-A | 2 | 18,65 | 0,044 | 0,66 | 1,82 |
| 12-2008-A | 1 | 32,23 | 0,162 | 0,90 | 1,50 |
| 13-2008-A | 2 | 28,11 | 0,096 | 0,63 | 1,50 |
| 14-2008-A | 2 | 12,31 | 0,026 | 0,43 | 1,66 |
| 15-2008-A | 1 | 42,43 | 0,091 | 1,20 | 1,59 |
| 16-2008-A | 2 | 19,01 | 0,127 | 0,53 | 1,53 |
| 17-2008-A | 2 | 19,70 | 0,119 | 0,62 | 1,40 |
| 18-2008-A | 1 | 20,37 | 0,194 | 0,73 | 1,55 |
| 19-2008-A | 3 | 9,39 | 0,055 | 0,66 | 1,80 |
| 20-2008-A | 1 | 17,45 | 0,113 | 0,67 | 1,62 |
| 21-2008-A | 1 | 22,64 | 0,139 | 0,64 | 1,35 |
| 22-2008-A | 1 | 23,12 | 0,148 | 0,75 | 1,24 |
| 23-2008-A | 2 | 17,26 | 0,073 | 1,03 | 1,40 |
| 24-2008-A | 3 | 18,67 | 0,076 | 0,89 | 1,79 |
| 25-2008-A | 1 | 37,36 | 0,178 | 0,59 | 1,42 |
| 26-2008-A | 5 | 13,30 | 0,061 | 0,88 | 1,73 |
| 27-2008-A | 3 | 12,26 | 0,064 | 0,68 | 1,84 |
| 28-2008-A | 2 | 18,56 | 0,152 | 0,98 | 1,44 |
| 29-2008-A | 4 | 24,72 | 0,125 | 0,92 | 1,84 |
| 30-2008-A | 2 | 22,97 | 0,088 | 1,40 | 1,53 |
| 31-2008-A | 2 | 16,93 | 0,146 | 1,03 | 1,38 |
| 32-2008-A | 2 | 3,57 | 0,046 | 0,73 | 0,97 |
| 33-2008-A | 1 | 21,19 | 0,105 | 1,02 | 1,30 |
| 34-2008-A | 1 | 22,08 | 0,054 | 1,19 | 1,44 |
| 35-2008-A | 2 | 9,25 | 0,128 | 0,80 | 1,36 |
| 36-2008-A | 3 | 8,40 | 0,041 | 0,85 | 1,88 |
| 37-2008-A | 1 | 40,90 | 0,173 | 1,31 | 1,62 |
| 38-2008-A | 1 | 48,38 | 0,093 | 1,38 | 1,59 |
| 39-2008-A | 1 | 27,28 | 0,226 | 0,94 | 1,41 |
| 40-2008-A | 1 | 21,72 | 0,146 | 0,92 | 1,28 |
| 41-2008-A | 1 | 24,30 | 0,139 | 0,97 | 1,40 |
| 42-2008-A | 1 | 29,28 | 0,138 | 1,17 | 1,49 |
| 43-2008-A | 1 | 40,13 | 0,161 | 1,19 | 1,66 |
| 45-2008-A | 1 | 27,77 | 0,204 | 1,13 | 1,51 |
| 46-2008-A | 1 | 28,78 | 0,137 | 1,27 | 1,64 |
| 47-2008-A | 1 | 42,17 | 0,097 | 1,30 | 1,65 |
| 48-2008-A | 1 | 30,50 | 0,083 | 0,99 | 1,60 |
| 49-2008-A | 1 | 38,90 | 0,145 | 1,24 | 1,53 |
| 50-2008-A | 1 | 26,74 | 0,127 | 1,09 | 1,47 |
| <i>Moyenne</i> | <i>1,6</i> | <i>24,44</i> | <i>0,106</i> | <i>0,91</i> | <i>1,53</i> |

(En laboratoire, la série 2008-A était nommée série 2008-C)

Tableau C.V
Spectrophotométrie de l'ADN total extrait des échantillons d'eau de surface récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption en juin 2008 (série de filtrations B).

| Échantillon | Passages sur PVPP | Concentration d'ADN (ng/µl) | A ₃₄₀ finale | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ |
|-------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 01-2008-B | 1 | 38,82 | 0,084 | 0,82 | 1,32 |
| 02-2008-B | 2 | 24,95 | 0,145 | 0,74 | 1,52 |
| 03-2008-B | 1 | 35,54 | 0,110 | 0,97 | 1,39 |
| 04-2008-B | 1 | 0,25 | -0,057 | 0,27 | 0,23 |
| 05-2008-B | 1 | 51,08 | 0,373 | -28,54 | 1,34 |
| 06-2008-B | 1 | 49,32 | 0,428 | 13,68 | 1,23 |
| 07-2008-B | 1 | 41,32 | 0,206 | -3,81 | 1,37 |
| 08-2008-B | 1 | 26,89 | 0,104 | -0,98 | 1,24 |
| 09-2008-B | 1 | 34,03 | -0,116 | 0,99 | 1,37 |
| 10-2008-B | 1 | 57,51 | 0,018 | 0,96 | 1,29 |
| 11-2008-B | 1 | 20,99 | 0,061 | 0,80 | 1,32 |
| 12-2008-B | 1 | 35,87 | 0,043 | 0,88 | 1,32 |
| 13-2008-B | 3 | 17,38 | 0,127 | 0,46 | 1,38 |
| 14-2008-B | 1 | 31,60 | 0,025 | 0,82 | 1,28 |
| 15-2008-B | 1 | 41,27 | 0,139 | 1,11 | 1,62 |
| 16-2008-B | 1 | 40,90 | 0,114 | 0,13 | 1,23 |
| 17-2008-B | 1 | 27,99 | -0,059 | 0,79 | 1,26 |
| 18-2008-B | 1 | 28,57 | 0,156 | 0,54 | 1,13 |
| 19-2008-B | 1 | 20,11 | 0,197 | 0,77 | 1,30 |
| 20-2008-B | 1 | 25,56 | 0,092 | 0,07 | 1,27 |
| 21-2008-B | 1 | 26,92 | 0,141 | 0,45 | 1,33 |
| 22-2008-B | 2 | 15,23 | 0,129 | 0,50 | 1,89 |
| 23-2008-B | 2 | 15,01 | 0,105 | 0,41 | 1,61 |
| 24-2008-B | 1 | 28,83 | 0,145 | 0,32 | 1,12 |
| 25-2008-B | 1 | 19,84 | 0,090 | 0,56 | 1,21 |
| 26-2008-B | 3 | 25,16 | 0,085 | 0,55 | 1,71 |
| 27-2008-B | 2 | 31,75 | 0,099 | 0,67 | 1,28 |
| 28-2008-B | 1 | 37,48 | 0,124 | 0,60 | 1,25 |
| 29-2008-B | 2 | 29,59 | 0,038 | 0,66 | 1,47 |
| 30-2008-B | 1 | 49,16 | 0,19 | 0,86 | 1,31 |
| 31-2008-B | 1 | 35,67 | 0,002 | 0,51 | 1,38 |
| 32-2008-B | 2 | 16,40 | 0,012 | 0,53 | 1,57 |
| 33-2008-B | 2 | 16,50 | -0,024 | 0,61 | 1,58 |
| 34-2008-B | 2 | 19,85 | 0,049 | 0,65 | 1,66 |
| 35-2008-B | 1 | 19,53 | 0,161 | 0,58 | 1,24 |
| 36-2008-B | 1 | 21,12 | 0,140 | 0,48 | 1,35 |
| 37-2008-B | 1 | 20,80 | -0,268 | 0,60 | 1,58 |
| 38-2008-B | 1 | 12,49 | -0,100 | 0,37 | 2,41 |
| 39-2008-B | 1 | 10,86 | 0,093 | 0,32 | 2,14 |
| 40-2008-B | 1 | 9,51 | 0,086 | 0,33 | 1,98 |
| 41-2008-B | 1 | 15,47 | -0,001 | 0,43 | 1,91 |
| 42-2008-B | 1 | 49,36 | 0,265 | 13,20 | 1,30 |
| 43-2008-B | 1 | 97,61 | 0,429 | 2,83 | 1,37 |
| 45-2008-B | 1 | 23,36 | -0,060 | 0,69 | 1,83 |
| 46-2008-B | 1 | 9,48 | 0,075 | 0,15 | 2,35 |
| 47-2008-B | 1 | 21,02 | 0,072 | 0,56 | 1,91 |
| 48-2008-B | 1 | 18,96 | 0,084 | 0,58 | 2,04 |
| 49-2008-B | 1 | 36,23 | 0,156 | -4,56 | 1,38 |
| 50-2008-B | 1 | 16,10 | -0,043 | 0,54 | 1,67 |
| Moyenne | 1,2 | 28,56 | 0,091 | 0,34 | 1,47 |

(En laboratoire, la série 2008-B était nommée série 2008-A)

Tableau C.VI
Spectrophotométrie de l'ADN total extrait des échantillons d'eau de surface récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption en octobre 2009 (série de filtration A).

| Échantillon | Passages sur PVPP | Concentration d'ADN (ng/µl) | A ₃₄₀ finale | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ |
|-------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 01-2009-A | 4 | 35,23 | 0,050 | 0,60 | 1,40 |
| 02-2009-A | 3 | 43,48 | 0,184 | 0,62 | 1,47 |
| 03-2009-A | 3 | 43,71 | 0,144 | 0,64 | 1,51 |
| 04-2009-A | 4 | 53,94 | 0,126 | 0,79 | 1,50 |
| 05-2009-A | 2 | 26,33 | 0,149 | 0,51 | 1,45 |
| 06-2009-A | 2 | 27,32 | 0,126 | 0,53 | 1,38 |
| 07-2009-A | 4 | 51,41 | 0,147 | 0,68 | 1,35 |
| 08-2009-A | 4 | 50,20 | 0,124 | 0,72 | 1,30 |
| 09-2009-A | 2 | 40,39 | 0,145 | 0,63 | 1,43 |
| 10-2009-A | 3 | 36,52 | 0,172 | 0,64 | 1,44 |
| 11-2009-A | 3 | 37,52 | 0,165 | 0,68 | 1,43 |
| 12-2009-A | 3 | 25,36 | 0,053 | 0,65 | 1,45 |
| 13-2009-A | 3 | 38,64 | 0,115 | 0,68 | 1,38 |
| 14-2009-A | 3 | 28,14 | 0,070 | 0,70 | 1,25 |
| 15-2009-A | 2 | 27,89 | 0,125 | 0,77 | 1,62 |
| 16-2009-A | 2 | 20,50 | 0,146 | 0,57 | 1,34 |
| 17-2009-A | 2 | 19,82 | 0,106 | 0,62 | 1,29 |
| 18-2009-A | 2 | 17,58 | 0,159 | 0,51 | 1,45 |
| 19-2009-A | 2 | 15,43 | 0,090 | 0,56 | 1,25 |
| 20-2009-A | 4 | 13,63 | 0,109 | 0,43 | 1,78 |
| 21-2009-A | 2 | 11,35 | -0,447 | 0,49 | 1,35 |
| 22-2009-A | 2 | 13,86 | 0,070 | 0,48 | 1,52 |
| 23-2009-A | 2 | 20,21 | 0,160 | 0,62 | 1,89 |
| 24-2009-A | 2 | 30,14 | 0,143 | 0,73 | 1,45 |
| 25-2009-A | 3 | 12,49 | 0,077 | 0,48 | 1,80 |
| 26-2009-A | 4 | 7,46 | 0,011 | 0,31 | 1,61 |
| 27-2009-A | 4 | 30,93 | 0,036 | 0,65 | 1,45 |
| 28-2009-A | 3 | 7,82 | 0,095 | 0,38 | 3,09 |
| 29-2009-A | 2 | 40,34 | 0,360 | 0,75 | 1,40 |
| 30-2009-A | 3 | 37,80 | 0,152 | 0,65 | 1,35 |
| 31-2009-A | 3 | 23,30 | 0,173 | 0,62 | 1,63 |
| 32-2009-A | 4 | 7,89 | -0,091 | 0,34 | 1,18 |
| 33-2009-A | 3 | 26,38 | 0,131 | 0,59 | 1,36 |
| 34-2009-A | 2 | 38,67 | 0,183 | 0,76 | 1,53 |
| 35-2009-A | 4 | 10,61 | 0,039 | 0,24 | 1,67 |
| 36-2009-A | 4 | 10,14 | 0,115 | 0,32 | 1,69 |
| 37-2009-A | 3 | 23,31 | 0,188 | 0,57 | 1,19 |
| 38-2009-A | 3 | 22,18 | 0,178 | 0,66 | 1,29 |
| 39-2009-A | 3 | 6,38 | 0,145 | 0,33 | 1,76 |
| 40-2009-A | 3 | 19,18 | 0,179 | 0,58 | 1,17 |
| 41-2009-A | 4 | 7,95 | 0,043 | 0,31 | 1,63 |
| 42-2009-A | 2 | 32,85 | 0,098 | 0,65 | 1,44 |
| 43-2009-A | 2 | 14,63 | 0,200 | 0,52 | 1,62 |
| 45-2009-A | 1 | 40,03 | 0,177 | 0,18 | 1,46 |
| 46-2009-A | 1 | 35,14 | 0,127 | 0,08 | 1,50 |
| 47-2009-A | 2 | 26,88 | 0,181 | 0,86 | 1,54 |
| 48-2009-A | 2 | 12,61 | 0,191 | 0,57 | 1,51 |
| 49-2009-A | 3 | 7,10 | 0,040 | 0,32 | 1,54 |
| 50-2009-A | 3 | 12,03 | 0,065 | 0,47 | 1,49 |
| 51-2009-A | 3 | 11,20 | 0,055 | 0,51 | 1,56 |
| 52-2009-A | 3 | 19,24 | 0,084 | 0,41 | 1,32 |
| Moyenne | 2,8 | 24,96 | 0,111 | 0,55 | 1,50 |

Tableau C.VII
Spectrophotométrie de l'ADN total extrait des échantillons d'eau de surface récoltés dans le bassin versant de la rivière l'Assomption en octobre 2009 (série de filtration B).

| Échantillon | Passages sur PVPP | Concentration d'ADN (ng/µl) | A ₃₄₀ finale | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ |
|-------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 01-2009-A | 3 | 6,89 | 0,097 | 0,17 | -6,75 |
| 02-2009-A | 2 | 20,07 | -0,531 | 0,60 | 1,58 |
| 03-2009-A | 1 | 24,22 | 0,137 | 0,68 | 1,69 |
| 04-2009-A | 1 | 33,96 | 0,082 | 0,71 | 1,54 |
| 05-2009-A | 1 | 10,48 | 0,139 | 0,38 | 1,46 |
| 06-2009-A | 1 | 21,57 | 0,059 | 0,52 | 1,24 |
| 07-2009-A | 1 | 15,49 | 0,194 | 0,41 | 1,60 |
| 08-2009-A | 1 | 20,02 | 0,152 | 0,60 | 1,36 |
| 09-2009-A | 1 | 50,08 | 0,137 | 0,87 | 1,74 |
| 10-2009-A | 1 | 28,99 | 0,121 | 0,66 | 1,62 |
| 11-2009-A | 1 | 26,80 | 0,057 | 0,57 | 1,64 |
| 12-2009-A | 2 | 20,24 | 0,062 | 0,48 | 1,91 |
| 13-2009-A | 2 | 17,27 | -0,105 | 0,37 | 1,76 |
| 14-2009-A | 2 | 16,97 | 0,163 | 0,43 | 1,56 |
| 15-2009-A | 2 | 12,36 | -0,073 | 0,33 | 1,78 |
| 16-2009-A | 2 | 9,60 | -0,016 | 0,31 | 1,54 |
| 17-2009-A | 2 | 9,86 | -0,016 | 0,30 | 1,78 |
| 18-2009-A | 1 | 15,51 | 0,025 | 0,52 | 1,22 |
| 19-2009-A | 1 | 18,42 | 0,177 | 0,57 | 1,45 |
| 20-2009-A | 3 | 10,54 | 0,202 | 0,28 | 2,65 |
| 21-2009-A | 1 | 23,73 | 0,178 | 0,36 | 1,24 |
| 22-2009-A | 1 | 13,79 | 0,011 | 0,82 | 1,37 |
| 23-2009-A | 1 | 13,52 | 0,137 | 0,74 | 1,32 |
| 24-2009-A | 1 | 11,84 | 0,016 | 0,89 | 1,62 |
| 25-2009-A | 1 | 13,11 | -0,010 | 0,82 | 1,33 |
| 26-2009-A | 1 | 28,41 | 0,196 | 0,78 | 1,30 |
| 27-2009-A | 3 | 21,07 | 0,161 | 0,70 | 1,39 |
| 28-2009-A | 1 | 25,90 | 0,098 | 0,82 | 1,34 |
| 29-2009-A | 2 | 78,84 | 0,193 | 1,38 | 1,76 |
| 30-2009-A | 1 | 18,51 | 0,053 | 0,80 | 1,42 |
| 31-2009-A | 1 | 21,29 | 0,063 | 0,82 | 1,45 |
| 32-2009-A | 1 | 12,04 | 0,059 | 0,65 | 1,31 |
| 33-2009-A | 1 | 16,38 | -0,020 | 1,04 | 1,47 |
| 34-2009-A | 1 | 26,00 | -0,005 | 0,87 | 1,55 |
| 35-2009-A | 1 | 9,42 | -0,008 | 0,57 | 1,17 |
| 36-2009-A | 1 | 9,13 | 0,058 | 0,68 | 1,21 |
| 37-2009-A | 1 | 21,71 | 0,045 | 0,83 | 1,37 |
| 38-2009-A | 1 | 32,44 | 0,036 | 0,91 | 1,56 |
| 39-2009-A | 1 | 10,56 | 0,023 | 0,55 | 1,63 |
| 40-2009-A | 1 | 10,96 | 0,013 | 0,48 | 1,39 |
| 41-2009-A | 1 | 38,75 | 0,167 | 0,73 | 1,34 |
| 42-2009-A | 1 | 16,30 | 0,058 | 0,83 | 1,41 |
| 43-2009-A | 1 | 6,15 | 0,016 | 0,63 | 1,43 |
| 45-2009-A | 1 | 20,13 | 0,067 | 0,90 | 1,54 |
| 46-2009-A | 1 | 14,73 | 0,004 | 0,96 | 1,49 |
| 47-2009-A | 1 | 24,04 | 0,024 | 0,92 | 1,46 |
| 48-2009-A | 1 | 3,69 | -0,018 | 0,36 | 1,57 |
| 49-2009-A | 1 | 16,68 | 0,030 | 0,91 | 1,71 |
| 50-2009-A | 1 | 16,57 | 0,065 | 0,72 | 1,64 |
| 51-2009-A | 1 | 9,32 | 0,023 | 0,58 | 1,44 |
| 52-2009-A | 1 | 12,76 | 0,023 | 0,84 | 1,65 |
| Moyenne | 1,3 | 19,36 | 0,060 | 0,66 | 1,36 |

