

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

Suivi de la contamination fécale dans la grande région de Montréal

Par
Marc-André Blais

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Claude Guertin
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Tom Edge
Environnement Canada
Centre canadien des eaux intérieures
(Burlington, ON)

Directeur de recherche

Richard Villemur
INRS-Institut Armand-Frappier

Codirecteur de recherche

Pierre Payment
INRS-Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche Richard Villemur ainsi que mon codirecteur Pierre Payment pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ce projet de recherche ainsi que pour leurs expertises scientifiques.

Je remercie tous les collaborateurs qui ont participé à ce projet de recherche incluant Sarah Dorner, Mariam Hajj-Mohamad, Mounia Hachad et Hélène Guérineau du CREDEAU à l'École Polytechnique de Montréal.

Je tiens à souligner l'appui technique de Karla Vazquez, l'aide de Claude Guertin pour les analyses statistiques, les membres du laboratoire du professeur Villemur : Christine Martineau, Florian Mauffrey, Geneviève Payette ainsi que tous les membres du GRME.

Ce projet a été réalisé grâce au support financier du CRSNG, de la Fondation Armand-Frappier ainsi que de la Fondation Desjardins.

RÉSUMÉ

L'infrastructure hydrique dans la région métropolitaine de Montréal est vieillissante et dégradée. Les eaux des égouts sanitaires, qui sont normalement traitées par des stations de traitement des eaux usées, peuvent s'écouler dans les égouts pluviaux et ainsi se déverser directement dans les cours d'eau avoisinants. Ceci peut mener à la contamination par des microorganismes pathogènes des sources d'eau potable et des zones récréatives. Les animaux urbains tels les rats laveurs qui trouvent refuge dans les égouts pluviaux peuvent également contribuer au problème de contamination fécale. Le dépistage des sources de pollution microbienne ou "microbial source tracking" (MST) est une discipline scientifique en développement qui vise à trouver l'origine de la contamination fécale dans les eaux. L'ADN mitochondrial ainsi que certaines bactéries spécifiques à un organisme hôte sont deux approches utilisées pour dépister l'origine de la contamination fécale afin de guider les municipalités dans la réfection de leurs infrastructures hydriques. Ce projet, effectué en partenariat avec l'École Polytechnique de Montréal, avait pour but de détecter et de quantifier la contamination fécale d'origine humaine à plusieurs sites de la grande région de Montréal en utilisant deux marqueurs génétiques de contamination fécale humaine. Cinq sites ayant des problématiques hydriques particulières ont été échantillonnés pendant les étés 2012 et 2013 et l'ADN extrait par filtration. Des marqueurs mitochondriaux et bactériens spécifiques à l'humain ont été amplifiés par la réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour permettre leur détection. Les marqueurs ont ensuite été quantifiés par PCR en temps réel pour les échantillons positifs. Un décompte d'*Escherichia coli* a aussi été effectué par le consortium de recherche. La contamination fécale a été détectée et quantifiée à tous les sites échantillonnés. Une étude de corrélation entre l'ADN mitochondrial humain et le marqueur *Bacteroides* HF183 démontre l'efficacité de l'ADN mitochondrial comme marqueur de contamination fécale humaine ($R^2=0.48$ et $p<0.0001$). Une étude approfondie d'un ruisseau a été effectuée pour déterminer l'origine de la contamination. Des niveaux élevés de contamination fécale ont été détectés sans variations significatives aux différentes stations d'échantillonnage. Des niveaux élevés ont ensuite été détectés dans un réseau d'égouts situé en amont du ruisseau. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse que le réseau d'égouts pluviaux 1 était la source probable de la contamination du ruisseau situé en aval. Des amorces ciblant l'ADN mitochondrial du rat laveur ainsi qu'une sonde TaqMan ciblant l'ADN mitochondrial humain ont aussi été développées.

TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION	1
2	REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
2.1	LA CONTAMINATION FÉCALE DE L'EAU	3
2.1.1	<i>Problèmes et impacts de la contamination fécale des eaux de surfaces</i>	<i>3</i>
2.1.2	<i>Contamination fécale des sources d'eau potable.....</i>	<i>4</i>
2.1.3	<i>Source de la contamination fécale dans les zones urbaines.....</i>	<i>4</i>
2.2	SUIVI DE LA CONTAMINATION FÉCALE	7
2.2.1	<i>Suivi de la contamination fécale par les microorganismes pathogènes.....</i>	<i>7</i>
2.2.2	<i>Suivi de la contamination fécale à l'aide de microorganismes indicateurs.....</i>	<i>8</i>
2.2.3	<i>Suivi de l'origine de la contamination fécale avec les méthodes dépendantes de la culture et d'une librairie bactérienne</i>	<i>10</i>
2.2.4	<i>Suivi de l'origine de la contamination fécale par PCR de marqueurs génétiques</i>	<i>10</i>
2.2.5	<i>Suivi de l'origine de la contamination fécale par PCR de bactéries spécifiques à un organisme hôte.....</i>	<i>11</i>
2.2.6	<i>Suivi de l'origine de la contamination fécale par PCR en utilisant l'ADN mitochondrial des cellules eucaryotes</i>	<i>12</i>
2.2.7	<i>Suivi de l'origine de la contamination fécale avec les marqueurs chimiques.....</i>	<i>15</i>
2.2.8	<i>Suivi de la contamination fécale avec les sédiments.....</i>	<i>16</i>
3	MATÉRIEL ET MÉTHODE	17
3.1	SITES ÉCHANTILLONNÉS	17
3.1.1	<i>Ruisseau 1.....</i>	<i>17</i>
3.1.2	<i>Réseau d'égouts pluviaux 1 (bassin versant)</i>	<i>20</i>
3.1.3	<i>Réseau d'égouts pluviaux 2 (bassin versant)</i>	<i>21</i>
3.1.4	<i>Ruisseau 2.....</i>	<i>22</i>
3.1.5	<i>Canal 1.....</i>	<i>23</i>
3.2	ANALYSE DES ÉCHANTILLONS	23
3.2.1	<i>Échantillonnage</i>	<i>23</i>
3.2.2	<i>Filtration et culottage des échantillons</i>	<i>23</i>
3.2.3	<i>Extraction de l'ADN</i>	<i>24</i>
3.2.4	<i>Amplification du gène ribosomal 16s bactériens par PCR.....</i>	<i>25</i>
3.3	AMPLIFICATION DE MARQUEURS DE CONTAMINATION FÉCALE	25
3.3.1	<i>Amplification de l'ADN mitochondrial humain</i>	<i>25</i>
3.3.2	<i>Amplification du marqueur 16S de Bacteroides HF183.....</i>	<i>26</i>
3.4	QUANTIFICATION DES MARQUEURS DE CONTAMINATION FÉCALE	27

3.4.1	Génération d'amplicons et préparation de la courbe d'étalonnage.....	27
3.4.2	Quantification de l'ADN mitochondrial humain.....	28
3.4.3	Quantification du marqueur 16s de <i>Bacteroides</i> HF183.....	29
3.5	CONCEPTION D'AMORCES ET D'UNE SONDE POUR LA DÉTECTION DE L'ADN MITOCHONDRIAL DU RATON LAVEUR ET DE L'HUMAIN	29
3.5.1	Conception d'amorces ciblant l'ADN mitochondrial du raton laveur (<i>Procyon lotor</i>)	29
3.5.2	Conception d'une sonde TaqMan pour la détection de l'ADN mitochondrial humain	31
3.6	ANALYSES STATISTIQUES.....	32
3.6.1	Analyse de la corrélation entre le marqueur <i>Bacteroides</i> HF183 et l'ADN mitochondrial humain	32
3.6.2	Analyse de l'origine de la contamination fécale du ruisseau 1	32
4	RÉSULTATS.....	34
4.1	ÉCHANTILLONNAGE ET ANALYSE DES ÉCHANTILLONS.....	34
4.1.1	Échantillonnage pour les étés 2012 et 2013	34
4.1.2	Extraction d'ADN et test d'inhibitions.....	35
4.1.3	Détection des marqueurs de contamination fécale HF183 et ADN mitochondrial dans les échantillons d'eau et de sédiments.....	36
4.1.4	Quantification des marqueurs de contamination fécale HF183 et ADN mitochondrial dans les échantillons d'eau	38
4.1.5	Analyse de corrélation entre le marqueur HF183 et l'ADN mitochondrial.....	43
4.2	AMORCES POUR L'ADN MITOCHONDRIAL DU RATON LAVEUR ET SONDE TAQMAN POUR LA QUANTIFICATION DE L'ADN MITOCHONDRIAL HUMAIN	45
4.2.1	Test des amorces pour la détection de l'ADN mitochondrial du raton laveur.....	45
4.2.2	Test de la sonde TaqMan pour la quantification de l'ADN mitochondrial	46
5	DISCUSSION	48
5.1	ANALYSE DES ÉCHANTILLONS	48
5.1.2	Corrélation entre le marqueur <i>Bacteroides</i> HF183 et l'ADN mitochondrial	51
5.1.3	Comparaison des méthodes de détection de la contamination fécale en milieu urbain.....	52
5.2	CONCEPTION D'AMORCE ET DE SONDE TAQMAN	53
5.2.1	Amorces ciblant l'ADN mitochondrial du raton laveur (<i>Procyon lotor</i>).....	53
5.2.2	Sonde TaqMan pour la quantification de l'ADN mitochondrial humain	54
6	CONCLUSION	56
7	RÉFÉRENCES.....	57

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 2.1	ORGANISMES INDICATEURS POUR LA DÉTECTION D'UNE CONTAMINATION FÉCALE DANS L'EAU	8
TABLEAU 2.2	LIMITE TOLÉRÉE SELON SANTÉ CANADA DE LA BACTÉRIE INDICATRICE DE CONTAMINATION FÉCALE <i>E. COLI</i> DANS L'EAU SELON L'UTILISATION	9
TABLEAU 3.1	AMORCES UTILISÉES DANS CETTE ÉTUDE	33
TABLEAU 4.1	ÉCHANTILLONS REÇUS POUR CHAQUE SITE	34
TABLEAU 4.2	RÉSULTATS DE LA MOYENNE DU NIVEAU DES MARQUEURS DE CONTAMINATION FÉCALE D'ORIGINE HUMAINE AINSI QUE DU DÉNOMBREMENT D' <i>E. COLI</i> POUR LE RUISSEAU 1 EN FONCTION DES STATIONS ÉCHANTILLONNÉES (N=6 POUR CHAQUE STATIONS).....	39
TABLEAU 4.3	RÉSULTATS DE LA DÉTECTION ET DE LA QUANTIFICATION DE LA CONTAMINATION FÉCALE POUR DEUX MARQUEURS DE CONTAMINATION FÉCALE D'ORIGINE HUMAINE AINSI QUE DU DÉNOMBREMENT D' <i>E. COLI</i> POUR LE RÉSEAU D'ÉGOUTS PLUVIAUX 1 EN FONCTION DES STATIONS ÉCHANTILLONNÉES.	40
TABLEAU 4.4	RÉSULTATS DE LA DÉTECTION ET DE LA QUANTIFICATION DE LA CONTAMINATION FÉCALE POUR DEUX MARQUEURS DE CONTAMINATION FÉCALE D'ORIGINE HUMAINE AINSI QUE DU DÉNOMBREMENT D' <i>E. COLI</i> POUR LE RÉSEAU D'ÉGOUTS PLUVIAUX 2 EN FONCTION DES STATIONS ÉCHANTILLONNÉES.	41
TABLEAU 4.5	RÉSULTATS DE LA DÉTECTION ET DE LA QUANTIFICATION DE LA CONTAMINATION FÉCALE POUR DEUX MARQUEURS DE CONTAMINATION FÉCALE D'ORIGINE POUR LE RUISSEAU 2 EN FONCTION DES STATIONS ÉCHANTILLONNÉES.	42
TABLEAU 4.6	RÉSULTATS DE LA DÉTECTION ET DE LA QUANTIFICATION DES MARQUEURS DE CONTAMINATION FÉCALE DANS LE CANAL 1	43

LISTE DES FIGURES

FIGURE 2.1	DÉVERSEMENT DES EAUX USÉES D'ÉGOUT UNITAIRE, À GAUCHE PAR TEMPS SEC ET À DROITE LORS DES PRÉCIPITATIONS	5
FIGURE 2.2	REPRÉSENTATION DU SYSTÈME D'ÉGOUTS SÉPARÉS; EN ROUGE L'ÉGOUT SANITAIRE ET EN BLEU L'ÉGOUT PLUVIAL.....	6
FIGURE 2.3	SCHÉMATISATION DES DOMMAGES CAUSÉS PAR LES RACINES D'ARBRES COMME SOURCE D'INFILTRATION D'EAU SANITAIRE DANS L'ÉGOUT PLUVIAL.....	7
FIGURE 2.4	GÉNOME MITOCHONDRIAL HUMAIN	13
FIGURE 3.1	RUISSEAU 1 AVEC LES SITES ÉCHANTILLONNÉS (POINTS JAUNES) AINSI QUE LES EXUTOIRES D'ÉGOUTS PLUVIAUX (FLÈCHES ROUGES) ET LA DIRECTION DE L'ÉCOULEMENT (FLÈCHE JAUNE)	18
FIGURE 3.2	PARTIE NON CANALISÉE DU RUISSEAU 1.....	18
FIGURE 3.3	RÉSEAU D'ÉGOUTS PLUVIAUX 1 (CONTOUR ROUGE) SITUÉ EN AMONT DU RUISSEAU 1 (LIGNE BLEUE) ET LOCALISATION DES SITES ÉCHANTILLONNÉS (POINTS VERTS) AINSI QUE LA DIRECTION DE L'ÉCOULEMENT (FLÈCHE JAUNE).....	20
FIGURE 3.4	RÉSEAU D'ÉGOUTS PLUVIAUX 2 (CONTOUR ROUGE) AVEC LES SITES ÉCHANTILLONNÉS (POINTS ROUGES) ET LA DIRECTION DE L'ÉCOULEMENT (FLÈCHE JAUNE).....	21
FIGURE 3.5	RUISSEAU 2 AVEC LES SITES ÉCHANTILLONNÉS (POINTS ROUGES) AINSI QUE LES EXUTOIRES DES ÉGOUTS PLUVIAUX (FLÈCHES ROUGES) ET LA DIRECTION DE L'ÉCOULEMENT (FLÈCHE JAUNE).....	22
FIGURE 3.6	MATÉRIEL POUR LA FILTRATION DES ÉCHANTILLONS	24
FIGURE 4.1	EXEMPLE DE RÉSULTATS OBTENUS POUR LA VISUALISATION DES ÉCHANTILLONS D'ADN.	35
FIGURE 4.2	EXEMPLE DE RÉSULTATS POUR LE TEST D'AMPLIFICATIONS PAR PCR DU GÈNE DE L'ARNr 16S. .	36
FIGURE 4.3	EXEMPLE DE RÉSULTATS D'ÉLECTROPHORÈSE POUR LA DÉTECTION DES MARQUEURS DE CONTAMINATION FÉCALE HUMAINE MITOCHONDRIAL PAR ÉLECTROPHORÈSE	37
FIGURE 4.4	RÉGRESSION LINÉAIRE ENTRE LE MARQUEUR D'ADN MITOCHONDRIAL HUMAIN ET LE MARQUEUR <i>BACTEROIDES</i> HF183 ($R^2 = 0.4746$ ET $P < 0.0001$).	44
FIGURE 4.5	EXEMPLE DE RÉSULTATS POUR LA DÉTECTION DE L'ADN MITOCHONDRIAL DU RATON LAVEUR AVEC LES ÉCHANTILLONS DU CANAL 1.	45
FIGURE 4.6	COMPARAISON DE LA QUANTIFICATION DE L'ADN MITOCHONDRIAL HUMAIN EN UTILISANT UNE SONDE TAQMAN (A) ET EN UTILISANT LE SYBR GREEN I (B) POUR LES MÊMES AMORCES.....	47

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

CREDEAU : Centre de recherche, développement et validation des technologies et procédés en traitement des eaux à l'École Polytechnique de Montréal

dNTP : Désoxyribonucléotides triphosphate

NPP : Nombre le plus probable

Mt : Mitochondrial

Pb : Paire de bases

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

qPCR : Réaction en chaîne par polymérase quantitative

1 INTRODUCTION

Comme pour plusieurs municipalités au Canada, l'infrastructure hydrique de la grande région de Montréal est vieillissante et dégradée. Plusieurs égouts sont affectés par le problème des raccordements inversés qui se produit lorsque les égouts sanitaires sont branchés ou lorsqu'ils s'écoulent dans les égouts pluviaux, entraînant une contamination fécale des cours d'eau urbains. La forte densité d'animaux urbains, sauvages ou domestiques, tels que les rats, les chats, les chiens et les oiseaux, est aussi une source de contamination fécale.

Les travaux, présentés dans ce mémoire, s'inscrivent dans un projet plus vaste et multidisciplinaire d'ingénierie et de modélisation hydrique du Centre de recherche, développement et validation des technologies et procédés de traitement des eaux (CREDEAU), un consortium de l'École Polytechnique de Montréal, l'Université de Montréal, l'École de Technologie Supérieure et l'Université McGill. Dans le cadre de ce projet, le laboratoire du professeur Richard Villemur a reçu la tâche de détecter, quantifier et caractériser l'origine et la source de la contamination fécale de cinq cours d'eau de la grande région de Montréal en utilisant les marqueurs génétiques spécifiques à l'humain, soit le marqueur *Bacteroides* HF183 et l'ADN mitochondrial. En parallèle, l'équipe de recherche de la professeure Sarah Dorner de l'École Polytechnique de Montréal a effectué les décomptes d'*Escherichia coli* et l'équipe du professeur Sébastien Sauvé de l'Université de Montréal a fait l'analyse de marqueurs chimiques. Les résultats présentés dans ce mémoire seront éventuellement intégrés à ceux du projet global de l'École Polytechnique de Montréal. Ils pourraient permettre de faire des recommandations aux municipalités pour définir leurs priorités en matière d'infrastructures.

En regard du projet, trois objectifs ont été ciblés. Le premier objectif était d'effectuer une analyse de corrélation entre le niveau de deux marqueurs génétiques de contamination fécale spécifiques à l'humain, soit l'ARN ribosomal 16S de *Bacteroides* HF183 associé à l'humain et l'ADN mitochondrial humain à partir des échantillons positifs. Il est scientifiquement reconnu que *Bacteroides* HF183 est un excellent marqueur de la contamination fécale humaine. Pour sa part, l'emploi de l'ADN mitochondrial est une approche plus récente et moins acceptée dans la littérature scientifique. La détection de la contamination fécale humaine avec *Bacteroides* HF183 a fait l'objet de plusieurs études et revues et a été identifiée comme étant un excellent marqueur de contamination humaine. En comparaison, l'ADN mitochondrial est une approche plus récente et moins acceptée dans la littérature scientifique. Établir une corrélation significative entre l'ADN mitochondrial et *Bacteroides* HF183 humain permettrait de fournir des éléments qui pourront

démontrer que l'ADN mitochondrial est aussi efficace, voire complémentaire lors de la détection des sources de contamination fécale humaine. Avec le deuxième objectif, on cherchait à valider les outils de détection de la contamination fécale humaine. Il s'agit d'une étude de cas portant sur un ruisseau de la région de Montréal (ruisseau 1). On cherchait à déterminer l'origine probable de la contamination fécale humaine observée dans les différents échantillons prélevés le long du ruisseau. Finalement, le troisième objectif était de développer de nouveaux outils génétiques pour la détection de la contamination fécale. Des amorces pour la détection de l'ADN mitochondrial du raton laveur et d'une sonde TaqMan pour la quantification de l'ADN mitochondrial ont été conçues.

À partir des échantillons positifs, nous avons réussi à établir une corrélation entre l'ADN mitochondrial humain et le marqueur *Bacteroides* HF183 ce qui démontre l'utilité de ces marqueurs dans la détection de la contamination fécale humaine. Une étude de cas sur un ruisseau a permis de déterminer que l'origine de la contamination provenait essentiellement de la source du ruisseau. Une contamination fécale humaine a aussi été détectée pour plusieurs stations échantillonnées mettant en évidence l'impact des raccordements inversés sur la qualité de l'eau. Finalement, les amorces développées ont permis de faire la détection de contamination fécale du raton laveur et la sonde TaqMan a permis de quantifier l'ADN mitochondrial humain.

2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 La contamination fécale de l'eau

2.1.1 Problèmes et impacts de la contamination fécale des eaux de surfaces

La contamination fécale est l'une des nombreuses formes de contamination qui peuvent affecter les écosystèmes hydriques. La présence de microorganismes pathogènes dans la matière fécale tels que des virus, des bactéries et des protistes parasites rend la consommation ou les contacts avec de l'eau contaminée risqués pour la santé humaine. L'utilisation d'eau contaminée pour l'irrigation des fruits et légumes ainsi que l'exploitation de fruits de mer présente un risque alimentaire. La contamination fécale a aussi un impact économique, car elle peut affecter le développement d'activités récréatives et touristiques. Les maladies associées à la contamination fécale sont principalement gastro-intestinales et peuvent aussi être des infections de la peau, des yeux et des oreilles (Wade *et al.*, 2008). De nombreuses sources de contamination fécale potentielles peuvent affecter la qualité de l'eau. Les sources humaines proviennent principalement des rejets par les égouts sanitaires, traités ou non, déversés dans les cours d'eau. Les sources animales sont notamment associées aux élevages et à l'épandage de fumier. Les fortes pluies peuvent ensuite provoquer le ruissèlement vers les cours d'eau et la migration vers les nappes d'eau souterraine. La contamination animale peut aussi provenir de la faune sauvage et urbaine, par exemple celle provoquée par les rats laveurs.

Dans les pays en développement, les épidémies d'origine hydrique attribuées à la contamination fécale peuvent être très fréquentes (Ashbolt, 2004). Elles sont en partie expliquées par deux facteurs importants; un manque d'infrastructures et de traitements appropriés pour l'épuration de l'eau potable ainsi qu'un manque d'infrastructures pour le traitement et l'évacuation des eaux usées sanitaires. Dans les pays développés comme le Canada, la majorité de la population a accès à une eau potable purifiée. Les eaux usées sanitaires sont généralement traitées avant leur rejet, ce qui permet de limiter la contamination fécale des eaux de surface. Les législations et les programmes de protection de la qualité de l'eau devraient permettre d'éviter les épidémies d'origine hydrique attribuées à la contamination fécale dans les pays développés (Fawell *et al.*, 2003).

2.1.2 Contamination fécale des sources d'eau potable

Malgré les systèmes de protection en place, il ne faut pas sous-estimer les risques et les conséquences de la contamination de l'eau potable dans les pays développés. En mai 2000, la municipalité de Walkerton en Ontario a été affectée par l'une des pires contaminations de l'eau potable au Canada (Hrudey *et al.*, 2003). Sur une population estimée à 4800 personnes, 2300 sont tombées malades et sept sont décédées à la suite de la consommation d'eau contaminée par deux microorganismes pathogènes, soit les bactéries *E. coli* 0157:H7 et *Campylobacter jejuni*. La source de la contamination provenait du ruissèlement de fumier dans l'un des puits d'eau potable lors d'un épisode de fortes précipitations. Suite à une enquête publique déposée en 2002 par le juge O'Connor sur les événements survenus à Walkerton, plusieurs facteurs ayant mené à la tragédie ont été identifiés, notamment l'incompétence des opérateurs de la station de production d'eau potable, la chloration de l'eau insuffisante, une négligence par rapport au traitement de l'eau, le délai inacceptable entre l'identification du problème et l'avis d'ébullition et les données falsifiées (O'Connor, 2002). Dans le rapport du juge O'Connor, plusieurs recommandations sont abordées pour réduire la probabilité que des événements similaires se produisent. L'une des recommandations principales est la protection des sources d'eau potable contre la contamination fécale comme approche préventive. Suite au rapport sur les événements de Walkerton, un effort considérable a été mis en place pour réduire la contamination des sources d'eau potable et les règlements de la majorité des provinces ont été mis à jour.

2.1.3 Source de la contamination fécale dans les zones urbaines

La problématique de la contamination fécale est très différente dans les zones agricoles et dans les zones urbaines. Il y a trois grandes sources de contamination fécale en milieu urbain : le trop-plein d'égouts unitaires, la contamination des égouts sanitaires par les égouts pluviaux et la contamination d'origine animale. Les égouts unitaires sont des égouts qui reçoivent à la fois l'eau sanitaire municipale et l'eau de pluie (NPDES, 2012). Par temps sec, l'eau usée est traitée à une station de traitement des eaux usées. Lors de pluies excessives ou lors de la fonte des neiges, l'eau peut alors surcharger la station de traitement des eaux usées, ce qui provoque un débordement directement dans un cours d'eau. Une partie de l'eau rejetée est de l'eau non traitée, ce qui contribue au problème de contamination fécale tel que démontré dans la figure 2.1. Généralement, les égouts unitaires sont des infrastructures qui sont plus

anciennes et qui se retrouvent dans les municipalités fondées avant 1940. Les égouts unitaires existants font l'objet de plusieurs réglementations et de suivi au Canada pour limiter leurs impacts sur la qualité de l'eau. La fréquence et la quantité d'eau déversées par les trop-pleins sont extrêmement variables selon l'égout et le volume de précipitation. Plusieurs stratégies ont été développées pour limiter l'impact des trop-pleins d'égout unitaires, notamment la construction de larges bassins pour retenir l'eau excédentaire en temps de pluie et le contrôle en temps réel du trop-plein des égouts unitaires.

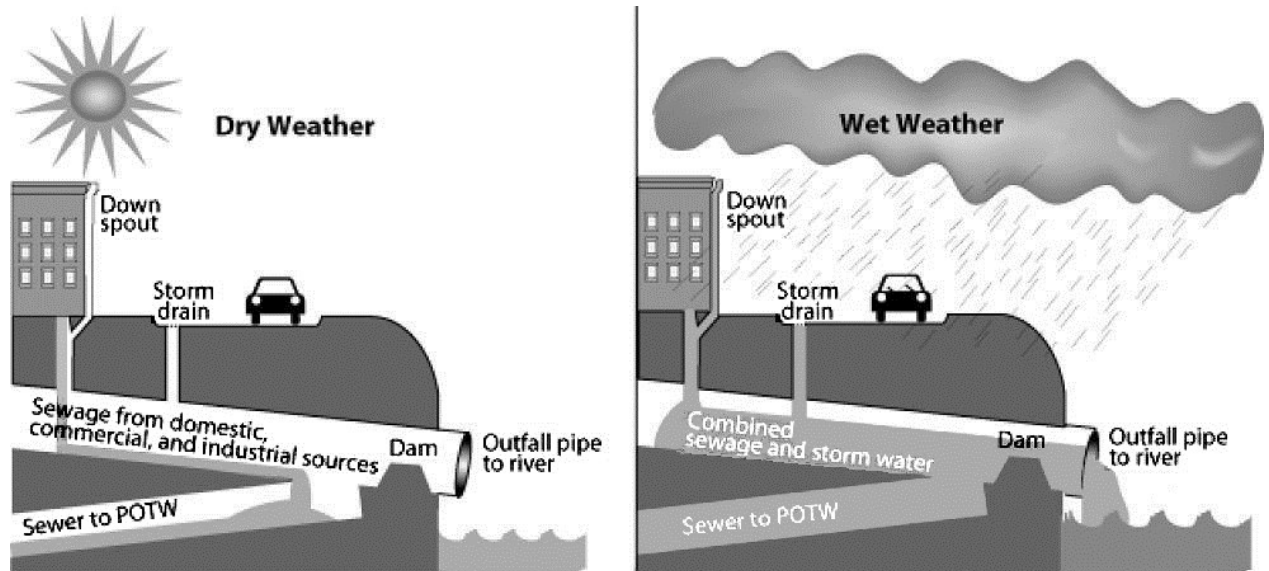


Figure 2.1 Déversement des eaux usées d'égout unitaire, à gauche par temps sec et à droite lors des précipitations
(tiré d'EPA 2004)

La deuxième situation problématique concerne la contamination des cours d'eau par les égouts sanitaires (Lavoie, 2006). Dans ce système, les égouts pluviaux et les égouts sanitaires sont complètement séparés, ce qui est représenté à la figure 2.2. Les égouts pluviaux reçoivent l'eau de pluie en temps de précipitation et cette eau est envoyée directement dans les cours d'eau, alors que les égouts sanitaires reçoivent les eaux usées municipales qui sont envoyées à une station de traitement des eaux usées. Des problèmes peuvent survenir lorsque l'égout sanitaire est branché accidentellement à l'égout pluvial. Le résultat, qui est nommé « raccordement inversé », est dû au fait que les eaux usées se retrouvent dans les cours d'eau sans être traitées. Comme il est démontré à la figure 2.3, il est aussi possible que la dégradation de l'infrastructure d'égouts pluviaux et sanitaires ainsi que l'introduction de racines puisse mener à la contamination des égouts sanitaires dans les égouts pluviaux. Pour remédier au problème

des raccordements inversés ainsi qu'à la désuétude des infrastructures d'égouts, plusieurs municipalités ont élaboré des plans de dépistage des sites problématiques.

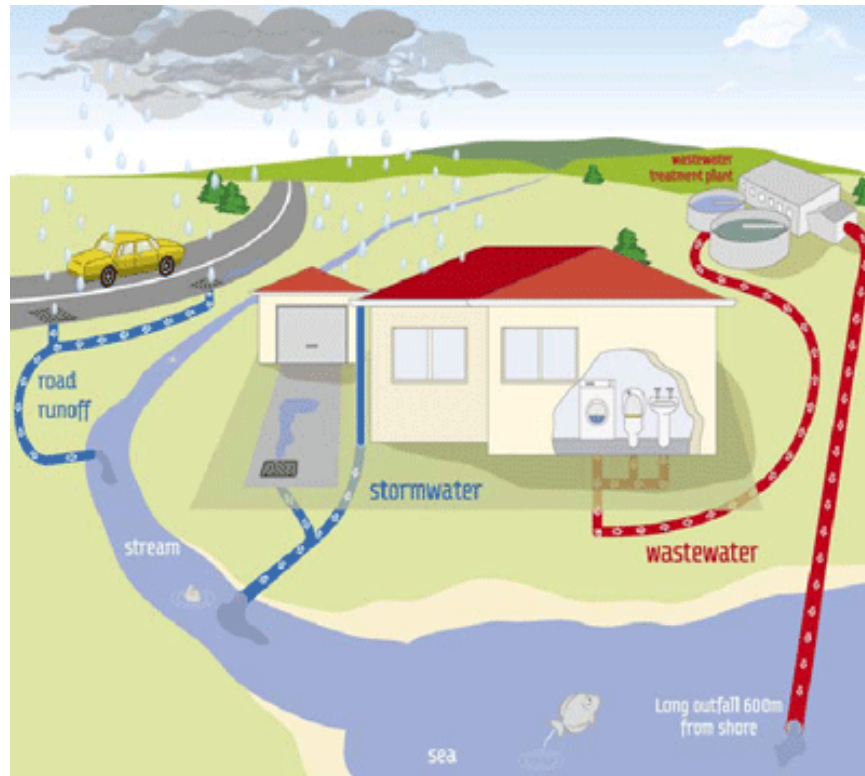


Figure 2.2 Représentation du système d'égouts séparés; en rouge l'égout sanitaire et en bleu l'égout pluvial
(tiré de City of Round Rock 2014)

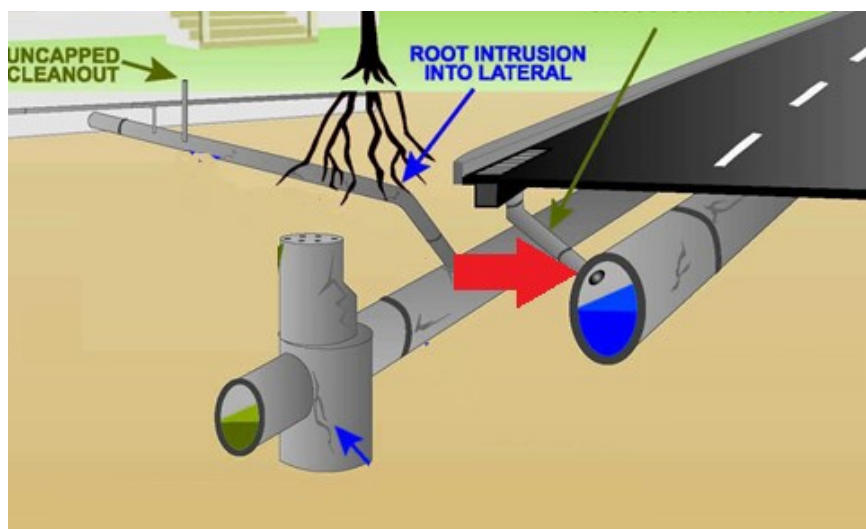


Figure 2.3 Schématisation des dommages causés par les racines d'arbres comme source d'infiltration d'eau sanitaire dans l'égout pluvial
(adapté de City of Bryan 2014)

2.2 Suivi de la contamination fécale

2.2.1 Suivi de la contamination fécale par les microorganismes pathogènes

La détection, la quantification et le suivi de la contamination fécale dans l'eau sont des étapes nécessaires pour trouver des solutions au problème de la contamination. Puisque le risque principal associé à la contamination fécale est dû aux microorganismes pathogènes, il peut sembler logique de faire le suivi en détectant les microorganismes pathogènes. En réalité, cette approche est problématique pour plusieurs raisons. Étant donné qu'il existe une très grande variété de microorganismes pathogènes (virus, bactéries, protistes, etc.), il faudrait effectuer un test spécifique pour chaque microorganisme. Les microorganismes pathogènes ne sont pas présents chez tous les individus d'une population et il est possible qu'il y ait une contamination fécale sans avoir un niveau détectable de microorganismes pathogènes. Les microorganismes pathogènes sont distribués de façon aléatoire et sont donc difficiles à suivre dans l'eau. Étant donné qu'ils sont généralement présents en très faible quantité, un volume important d'eau est requis pour réaliser une analyse des microorganismes pathogènes, ce qui complexifie la réalisation des analyses. Plusieurs microorganismes pathogènes sont non

spécifiques pour un organisme hôte et ne permettent donc pas de déterminer l'origine de la contamination fécale (Payment *et al.*, 2006).

2.2.2 Suivi de la contamination fécale à l'aide de microorganismes indicateurs

Étant donné les problèmes liés au suivi de la contamination fécale en ciblant les microorganismes pathogènes, une approche alternative préconise l'établissement de corrélation entre la concentration de ces pathogènes et le dénombrement d'organismes indicateurs non pathogènes. Ces organismes sont présents dans l'intestin de la plupart des animaux endothermes et sont relâchés dans la matière fécale. Étant donné qu'ils ne sont pas des organismes présents naturellement dans l'eau, leur présence est indicatrice d'une contamination fécale (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 Organismes indicateurs pour la détection d'une contamination fécale dans l'eau (adapté de Ferguson *et al.* (2011))

Organisme indicateur de contamination fécale	Type de milieu
Coliformes totaux	Eau douce
Coliformes fécaux	Eau douce
<i>E. coli</i>	Eau douce
Streptocoques fécaux	Eau saline
Entérocoques	Eau saline

Il est important de comprendre que ces indicateurs ainsi que les autres marqueurs qui seront présentés dans cette revue de littérature ne mesurent pas directement la présence de microorganismes pathogènes, mais sont plutôt des indicateurs du risque potentiel de la présence de microorganismes pathogènes dans l'eau. Au Canada, l'organisme indicateur de contamination fécale le plus utilisé est *Escherichia coli*. Cette bactérie à Gram négative vit en relation commensale dans le gros intestin des animaux endothermes et représente environ 0.1% des bactéries intestinales chez les humains (Eckburg *et al.*, 2005). Dans les fèces humaines, on dénombre généralement 10^5 à 10^9 *E. coli* par gramme de fèces (Hartley *et al.*, 1978). Généralement, *E. coli* est quantifiée dans l'eau par un dénombrement de colonies

thermotolérantes sur gélose nutritive avec un milieu et des conditions de croissances sélectives à partir d'un échantillon d'eau, ou plus spécifiquement avec un test utilisant un substrat ayant une affinité pour une enzyme retrouvée chez *E. coli*. Les tests sont simples, peu coûteux et rapides, ce qui permet de faire une détection et un suivi très efficaces de la contamination fécale dans l'eau (Kinzelman *et al.*, 2005). Plusieurs standards pour la qualité de l'eau ont été établis par Santé Canada en utilisant *E. coli* comme organisme indicateur de contamination fécale (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 Limite tolérée selon Santé Canada de la bactérie indicatrice de contamination fécale *E. coli* dans l'eau selon l'utilisation
(adapté de Lévesque *et al.* (2007) et Santé Canada (2012))

Utilisation de l'eau	Limite d' <i>E. coli</i> /100 mL accepté
Eau potable	0
Eau de baignade	200
Eau avec contacts secondaires (pêche, motomarine)	1000

Le problème de cette approche est dû au manque d'information quant à l'origine de contamination fécale. Étant donné qu'*E. coli* est présent chez la plupart des mammifères, la détection seule d'*E. coli* dans l'eau ne permet pas de déterminer de quel animal hôte provient la contamination. Comme il a été mentionné précédemment, la contamination fécale est un problème qui peut avoir plusieurs sources, notamment des sources humaines ainsi que des sources animales. Trouver l'origine de la contamination est cruciale pour l'identification du problème ainsi que pour la remédiation de la contamination fécale. Aussi, il est pertinent d'identifier spécifiquement la contamination d'origine humaine, car elle représente un plus grand risque pour la santé publique étant donné la spécificité de certains microorganismes pathogènes (Soller *et al.*, 2010). Un deuxième problème avec *E. coli* est la possibilité que cette bactérie puisse survivre et se multiplier en grande quantité à l'extérieur de l'intestin des mammifères, ce qui peut fausser l'analyse de la contamination. Ce problème survient particulièrement dans les régions tropicales où la température élevée de l'eau favorise la croissance d'*E. coli* (Ishii *et al.*, 2006). Certaines études ont démontré qu'*E. coli* pouvait survivre dans le sol sans avoir de contamination fécale récente, ce qui pourrait faussement porter à croire qu'un site est contaminé (Walk *et al.*, 2009).

2.2.3 Suivi de l'origine de la contamination fécale avec les méthodes dépendantes de la culture et d'une librairie bactérienne

L'utilisation des microorganismes indicateurs de contamination fécale est limitée par un manque d'information quant à l'origine de la contamination. Une discipline scientifique nommée «suivi de l'origine de la contamination» ou «source tracking» s'est développée dans les années 1980 ayant pour but de développer des techniques pour déterminer l'origine de la contamination fécale (Mara *et al.*, 1981). Les méthodes initiales étaient basées sur l'isolement de bactéries d'origine fécale ayant des caractéristiques morphologiques, phénotypiques et génétiques différentes selon l'organisme hôte. En comparant les caractéristiques des bactéries isolées dans l'eau avec les bactéries d'une librairie d'isolats, on peut déterminer la provenance de la contamination fécale. La morphologie des colonies, le profil de résistance aux antibiotiques, la consommation de certaines sources de carbone, le ribotypage ainsi que le polymorphisme de longueur des fragments de restriction par PCR ont tous été proposés avec l'utilisation d'*E. coli*. Ces approches qui sont dépendantes de la culture et de l'isolement des bactéries ainsi que d'une librairie bactérienne ont connu plusieurs difficultés qui ont été rapportées dans la littérature scientifique (Gordon, 2001). Premièrement, les coûts ainsi que la main-d'œuvre nécessaire à ces approches sont élevés ce qui les rend difficiles pour l'échantillonnage routinier. Des variations ainsi que des instabilités majeures tant au niveau phénotypique que génétique ont été observées chez *E. coli* au sein d'une même population hôte, ce qui complique l'analyse et l'interprétation des données et ne permet pas d'avoir une bonne reproductivité des résultats.

2.2.4 Suivi de l'origine de la contamination fécale par PCR de marqueurs génétiques

Puisque les techniques de suivi de l'origine de la contamination fécale en utilisant une librairie ainsi que l'isolement de bactéries sont coûteuses et peu reproductibles, des techniques ont été développées au moyen de la biologie moléculaire. Des éléments génétiques sont ciblés par PCR pour amplifier des régions spécifiques à un organisme hôte pour déterminer l'origine de la contamination (Field *et al.*, 2007). Ces techniques ont l'avantage d'éviter l'étape de culture et d'isolement de bactéries et ne requièrent pas de librairie bactérienne. Deux techniques ont connu un succès selon la littérature scientifique, soit la détection par PCR de bactéries spécifiques à un organisme hôte et la détection par PCR de régions spécifiques de l'ADN mitochondrial.

2.2.5 Suivi de l'origine de la contamination fécale par PCR de bactéries spécifiques à un organisme hôte

Dans l'intestin des mammifères, le groupe bactérien retrouvé en plus grande quantité est le groupe des bactéries anaréobes. Un des genres de bactériens, *Bacteroides*, est le genre bactérien dominant et représente 30% de toutes les bactéries dans l'intestin (Sears, 2005). Il est rapporté dans la littérature qu'on peut retrouver jusqu'à $5,4 \times 10^{10}$ bactéries par gramme de fèces humaines du genre *Bacteroides*, ce qui est plus élevé en comparaison avec *E. coli* (Franks *et al.*, 1998). *Bacteroides* entretient une relation commensale dans l'intestin de l'organisme hôte et est particulièrement important pour la digestion de carbohydrates complexes. Étant donné que ces bactéries sont présentes en grande quantité, elles sont une bonne cible pour la détermination de l'origine de la contamination fécale.

Plusieurs espèces, souches, ou isolats du genre *Bacteroides* ont été identifiés comme étant spécifiques pour un organisme hôte. Des études ont été effectuées en analysant des séquences du gène d'ARN ribosomique 16S de *Bacteroides* provenant d'échantillons de fèces humaines et d'animaux afin d'identifier des séquences uniques qui représentent des bactéries spécifiques à un hôte. Des amorces ont été développées pour des amplifications PCR à partir des séquences uniques, ce qui permet de les détecter dans l'ADN extrait d'échantillons d'eau et ainsi de déterminer l'origine de la contamination fécale (Bernhard *et al.*, 2000). Cette approche comporte l'avantage de ne pas avoir recours aux techniques de culture et d'isolement de bactéries. Des études subséquentes ont porté sur des séquences de protéines de surface des bactéries qui peuvent être spécifiques à leur association aux parois d'intestin de l'organisme hôte (Shanks *et al.*, 2009).

Cette approche a connu certaines limitations quant à la spécificité des bactéries à un organisme hôte. Les bactéries qui sont dites spécifiques ne sont pas toujours présentes dans l'ensemble de la population. Ceci peut être en partie expliqué par la diète, l'âge de l'organisme ainsi que l'utilisation d'antibiotiques qui ont un effet majeur sur la flore microbienne intestinale. Certains marqueurs de *Bacteroides* identifiés comme étant spécifiques à l'humain ont été retrouvés seulement en Amérique du Nord et non en Amérique du Sud, alors que certains marqueurs spécifiques aux espèces bovines ont été retrouvés chez les vaches laitières et non chez les vaches de boucherie. Certains marqueurs identifiés comme étant spécifiques pour un organisme hôte sont parfois retrouvés chez d'autres espèces complètement différentes dans

des études subséquentes. Ces facteurs peuvent compliquer les analyses ainsi qu'introduire des faux positifs et des faux négatifs.

Un marqueur d'ARN ribosomique 16S de *Bacteroides* spécifique à l'humain nommé HF183 a fait l'objet de plusieurs études et a été identifié comme étant l'un des marqueurs les plus performants pour la détection de la contamination fécale d'origine humaine. Il a été identifié en 2000 dans une analyse de l'ARN ribosomique 16S isolé à partir de fèces humaines et une paire d'amorces permettant de détecter ce marqueur par PCR a été développée (Bernhard *et al.*, 2000). En 2005, une approche par PCR quantitative a été développée en utilisant le marqueur HF183 (Seurinck *et al.*, 2005). Ceci a permis de quantifier les niveaux de contamination fécale spécifique humaine selon les sites échantillonnés, ce qui peut permettre de détecter géographiquement les sources de contamination. Plusieurs études ont évalué l'efficacité du marqueur HF183 dans la détection et quantification de la contamination fécale d'origine humaine, et il a été identifié comme étant l'un des marqueurs les plus spécifiques pour l'humain grâce à sa présence quasi ubiquitaire (malgré des différences géographiques majeures) et son absence chez les autres animaux (Boehm *et al.*, 2013, Layton *et al.*, 2013). Pour ces raisons, le marqueur HF183 a été sélectionné comme marqueur *Bacteroides* spécifique à l'humain pour notre étude.

2.2.6 Suivi de l'origine de la contamination fécale par PCR en utilisant l'ADN mitochondrial des cellules eucaryotes

L'intérêt pour les marqueurs génétiques spécifiques à un organisme hôte a grandi considérablement dans les années 2000 entre autres grâce au développement des techniques de biologie moléculaire telles que l'extraction de l'ADN et la PCR. En 2000, le professeur Richard Villemur en collaboration avec le professeur Pierre Payment ont développé une nouvelle approche pour identifier l'origine de la contamination fécale (Caldwell *et al.*, 2011). Ils ont proposé de cibler des éléments génétiques eucaryotes plutôt que des bactéries commensales. Étant donné que les cellules épithéliales de la paroi de l'intestin sont relâchées de façon continue et sont retrouvées en grande quantité dans les fèces, il serait théoriquement possible de cibler l'ADN génomique de ces cellules. L'approche initiale était de cibler par PCR l'ARN ribosomique 18S de l'ADN génomique des cellules. Une deuxième cible eucaryote beaucoup plus fructueuse a été identifiée, soit l'ADN mitochondrial (Caldwell *et al.*, 2011).

Les mitochondries sont l'organe eucaryote responsable de la production d'énergie pour les cellules. Les mitochondries auraient une origine procaryote, ce qui explique la présence d'ADN circulaire dans cet organe (Andersson *et al.*, 1999). L'ADN mitochondrial humain est de 16600 pb et encode pour 13 protéines, 2 gènes ribosomiaux ainsi que 22 ARNt, et est structurellement similaire chez tous les mammifères (Fig. 2.4). Malgré les similarités, il y a plusieurs différences génétiques dans le génome mitochondrial, et ce, même chez les espèces rapprochées.

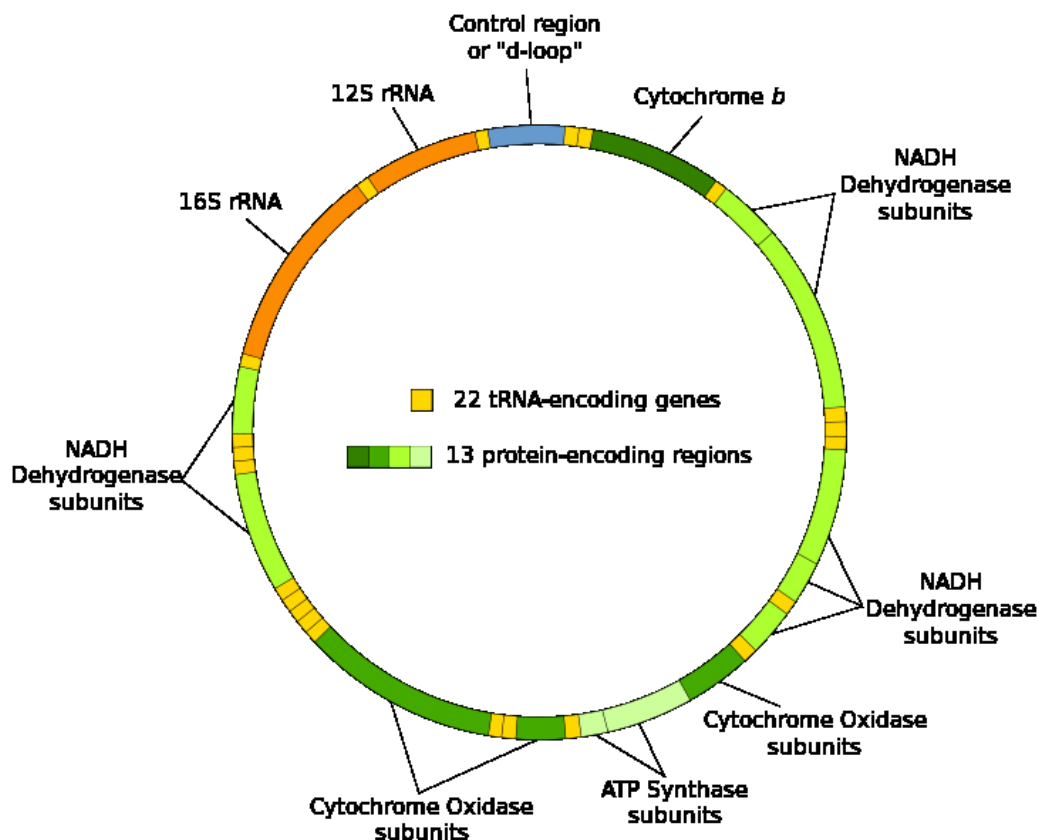


Figure 2.4 Génome mitochondrial humain
(image libre de droits d'auteur)

Comme il a été mentionné précédemment, les cellules épithéliales qui composent la paroi de l'intestin sont retrouvées dans les fèces en grande quantité et peuvent atteindre 10^8 cellules par gramme de fèces. La présence de ces cellules est expliquée par un phénomène apoptotique (Bullen *et al.*, 2006). Il a été démontré que l'apoptose des cellules laisse souvent l'ADN des mitochondries intactes en comparaison avec l'ADN génomique qui est rapidement

détruit, ce qui fait de l'ADN mitochondrial une meilleure cible par rapport à l'ADN génomique. Chaque cellule eucaryote contient une quantité de mitochondries qui peut varier entre 1400 et 2200, ce qui dépend grandement du type de cellule. Chaque mitochondrie contient 5 à 10 génomes mitochondriaux et donc chaque cellule peut avoir entre 7000 et 22000 copies de l'ADN mitochondrial (Caldwell *et al.*, 2011). Une étude a démontré qu'on pouvait retrouver jusqu'à $1,7 \times 10^7$ copies d'ADN mitochondrial par gramme de fèces, ce qui est amplement suffisant pour l'utiliser comme marqueur de contamination fécale (Schill *et al.*, 2008).

L'ADN mitochondrial avait déjà été utilisé avec succès dans les domaines de sciences de la médecine légale pour l'identification de personnes à partir d'échantillons biologiques ainsi que dans les domaines alimentaires pour contrer la fraude de l'étiquetage de la viande. Richard Villemur et Pierre Payment ont appliqué ces approches pour trouver l'origine de la contamination fécale dans l'eau en développant des amorces qui amplifient des régions spécifiques du génome mitochondrial. Un des grands avantages de l'utilisation de l'ADN mitochondrial est que cet élément génétique est toujours spécifique à l'individu hôte et qu'il est présent chez tous les individus de la population en comparaison avec les bactéries spécifiques qui peuvent parfois être absentes ou qui peuvent être retrouvées chez d'autres espèces (Caldwell *et al.*, 2011).

Les amorces ont initialement été développées pour cibler des régions de l'ADN mitochondrial de l'humain, bovin, porc et ovin selon une stratégie d'amplification en niche. Une première paire d'amorces ont été développée suivi d'une deuxième paire d'amorces qui amplifie une région à l'intérieur du produit de PCR ce qui a permis d'obtenir un meilleur limite de détection et une plus grande spécificité par rapport à une PCR simple (Martellini *et al.*, 2005).

L'approche initiale était de filtrer un échantillon d'eau et d'extraire l'ADN à partir d'un filtre et ensuite d'effectuer les amplifications pour déterminer l'origine de la contamination fécale. Les amorces ont permis de détecter la contamination fécale à partir d'échantillons d'eau pour les 4 espèces concernés (Martellini *et al.*, 2005). Depuis la publication de ces derniers résultats, plusieurs articles ont été publiés suivant l'article de Martellini sur l'utilisation de l'ADN mitochondrial pour déterminer l'origine de la contamination fécale dans l'eau. Des méthodes ont été développées utilisant des PCR multiplex, amorces universelles, essais dot blot, PCR quantitative, microarray pour cibler la contamination fécale du poulet, chien, chat, chevreuil, bernache, cheval, etc. (Caldwell *et al.*, 2009, Caldwell *et al.*, 2011, Caldwell *et al.*, 2007, Kortbaoui *et al.*, 2009, Martellini *et al.*, 2005, Vuong *et al.*, 2013). La petite taille du génome mitochondrial (~16000 pb) fait en sorte qu'il est séquencé très rapidement et à faible coût en

comparaison avec l'ADN génomique. Il y a donc une très grande disponibilité d'ADN mitochondrial séquencés et il est possible théoriquement de développer des amorces spécifiques pour chaque génome d'ADN mitochondrial disponible. L'ADN mitochondrial a été sélectionné comme l'un des deux marqueurs (avec *Bacteroides* HF183) spécifiques pour la contamination fécale d'origine humaine grâce au succès qu'a obtenu cette technique ainsi qu'à l'expertise au laboratoire du professeur Villemur avec l'utilisation des marqueurs mitochondriaux.

Certains problèmes liés à l'utilisation de marqueurs d'ADN mitochondrial ont été rapportés, notamment les risques de contamination par les opérateurs lors de l'échantillonnage et de l'analyse par PCR. Étant donné que les cellules de la peau et de cheveux contiennent des mitochondries, il est facile de contaminer un échantillon si on ne porte pas de gants et si l'équipement n'est pas stérile lorsqu'on fait l'analyse de la contamination fécale d'origine humaine. L'utilisation de l'amplification en niche fait en sorte que la quantité d'ADN nécessaire pour contaminer un échantillon est très faible. Il est donc très important de travailler en conditions stériles et d'inclure des contrôles négatifs. De plus, dans certaines conditions, l'ADN mitochondrial de la viande consommée peut «survivre» au processus digestif, se retrouver dans les fèces humaines et donner un signal positif erroné (Caldwell *et al.*, 2007). Par contre, la quantité d'ADN mitochondrial détectée par ce phénomène est très faible en comparaison avec l'ADN détecté de l'humain et ne cause généralement pas de problèmes majeurs d'analyse des données. La présence de l'ADN mitochondrial dans l'eau n'est pas nécessairement un indicateur de contamination fécale. Si on prend un échantillon d'eau à proximité d'une plage, il est possible qu'un signal positif détecté pour l'ADN mitochondrial humain soit expliqué par la peau et les cheveux des baigneurs sans qu'il y ait de contamination fécale (Caldwell *et al.*, 2011). Par contre, leur utilisation avec un autre marqueur tel le marqueur *Bacteroides* HF183 peut donner un résultat plus robuste aux analyses de détection de l'origine de la contamination fécale.

2.2.7 Suivi de l'origine de la contamination fécale avec les marqueurs chimiques

Une autre méthode qui peut permettre de déterminer l'origine de la contamination fécale est l'utilisation de marqueurs chimiques. Plusieurs composés chimiques retrouvés dans les égouts sanitaires sont spécifiques à l'humain et peuvent être détectés. La consommation de produits contenant de la caféine est très fréquente chez la population générale et est exclusive aux humains. La présence de la caféine ou de ses métabolites dans un cours d'eau peut donc

être indicateur d'une contamination d'origine humaine. Des produits pharmaceutiques tels que l'acétaminophène et la carbamazépine ont aussi été proposés comme marqueurs chimiques spécifiques à l'humain (Caldwell *et al.*, 2011, Sauvé *et al.*, 2012, Seiler *et al.*, 1999). La plupart de ces produits chimiques sont excrétés dans l'urine et ne sont donc pas directement des marqueurs de contamination fécale. Par contre, leur présence dans l'eau va être indicateur d'une contamination d'égout sanitaire, ce qui implique une contamination fécale. La variabilité de la demi-vie de ces produits chimiques peut permettre de faire la différence entre une contamination récente ou une contamination plus ancienne. L'utilisation de marqueurs chimiques comporte certains désavantages tels que le besoin d'appareils ainsi qu'une expertise spécialisée (HPLC, spectromètre de masse, etc.) en comparaison avec les analyses par PCR qui sont moins coûteuses et plus faciles à effectuer. Les marqueurs chimiques sont utiles pour faire la différence entre une contamination humaine et non humaine, mais ne peuvent généralement pas faire la différence entre les divers animaux, ce qui est possible avec l'ADN mitochondrial et les bactéries spécifiques.

Étant donné les avantages et les désavantages que présentent ces différentes méthodes pour déterminer l'origine de la contamination fécale ou des égouts sanitaires, il est recommandé d'utiliser plusieurs marqueurs en parallèle pour confirmer les résultats.

2.2.8 Suivi de la contamination fécale avec les sédiments

Une approche présentement en développement dans le suivi de la contamination fécale est de faire des analyses à partir de sédiments retrouvés au fond des cours d'eau échantillonnés en parallèle avec les échantillons d'eau (Guérineau *et al.*, 2014). L'échantillonnage de sédiments pourrait permettre de faire un suivi sur l'historique des contaminations cumulatives étant donné qu'*E. coli* peut survivre plus longtemps dans les sédiments que dans l'eau et est moins affecté par la dilution ainsi que le débit élevé qui peut compliquer les analyses. La carbamazépine, un produit pharmaceutique, a une demi-vie très longue dans les sédiments, ce qui pourrait permettre de déterminer si un site a été affecté par la contamination fécale pour une longue période de temps (Madoux-Humery *et al.*, 2013). En temps de précipitation, la remise en suspension des sédiments peut entraîner une augmentation anormale de la quantité de marqueurs de contamination fécale et ainsi biaiser les réponses obtenues.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODE

3.1 Sites échantillonnés

Cinq sites ont été sélectionnés et ont été échantillonnés par l'École Polytechnique de Montréal pendant les étés 2012 et 2013. Chaque site comporte une géographie et une problématique particulière et cette dernière est décrite en détail. Pour des raisons de confidentialité, l'emplacement des sites n'a pas été dévoilé.

3.1.1 Ruisseau 1

Le ruisseau 1 (**Fig. 3.1**) est un ruisseau urbain semi-canalisé dans un quartier résidentiel qui reçoit de l'eau pluviale. Comme plusieurs ruisseaux urbains de la grande région de Montréal, ce ruisseau était initialement à l'état naturel. Suite au développement résidentiel, le ruisseau a été canalisé, enfoui et redirigé. Le ruisseau a une partie non canalisée de 800 m qui traverse un parc fréquenté par des chiens et leurs maîtres, ce qui implique une source possible de contamination fécale d'origine animale ainsi qu'une possibilité de contact humain indirect avec l'eau (**Fig 3.2**).

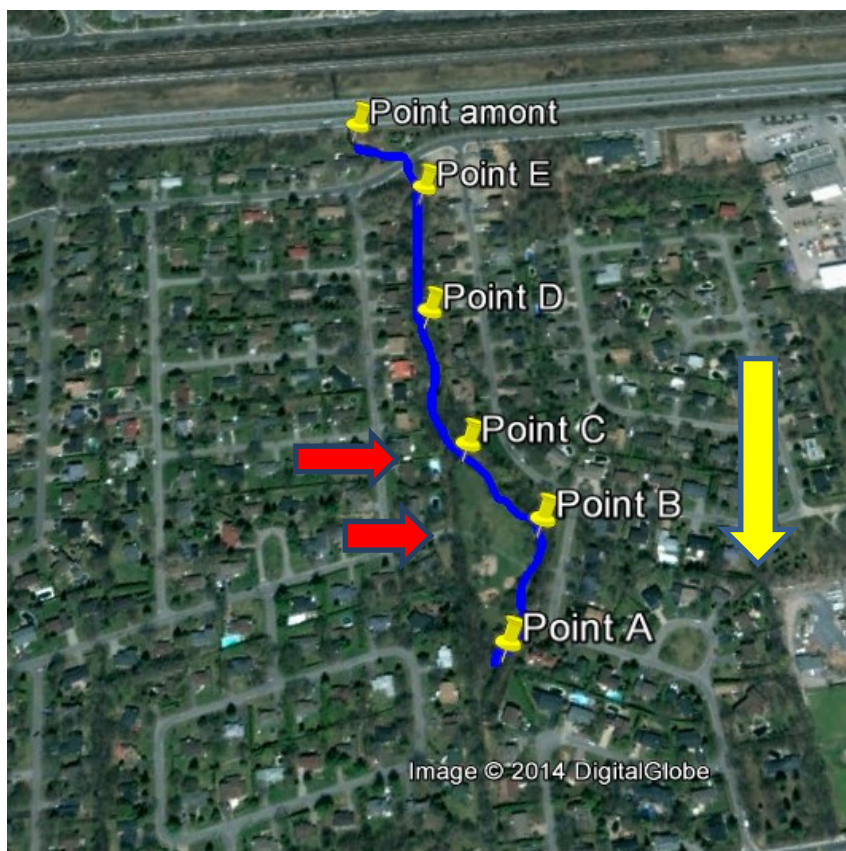


Figure 3.1 Ruisseau 1 avec les sites échantillonnés (points jaunes) ainsi que les exutoires d'égouts pluviaux (flèches rouges) et la direction de l'écoulement (flèche jaune)
(adapté de Google Maps, <http://maps.google.ca>)



Figure 3.2 Partie non canalisée du Ruisseau 1
(tiré de Google Maps, <http://maps.google.ca>)

Ce ruisseau avait déjà été échantillonné sommairement par un organisme municipal pour la détection d'*E. coli* et avait été identifié comme étant contaminé et possiblement affecté par les raccordements inversés. Six points sur la partie non canalisée du ruisseau ont été sélectionnés pour l'échantillonnage, ce qui couvre l'amont (point amont) qui représente le début du ruisseau jusqu'à l'aval du ruisseau (point A) qui est la fin du ruisseau et le début de la canalisation. L'échantillonnage a été effectué sur 6 jours en juin 2012; tous les échantillonnages ont été réalisés en absence de précipitations. Deux points, soit les points C et B, sont à proximité de sorties d'égouts pluviaux qui pourraient être affectés par les raccordements inversés. Si la source de la contamination fécale provient de ces points, les échantillons C et B devraient avoir un niveau de contamination fécale humaine significativement plus élevée que les autres points mesuré avec HF183, l'ADN mitochondrial et *E. coli*. Si les niveaux sont invariables, il est possible que la source de la contamination provienne de l'amont du ruisseau, qui inclut un réseau d'égouts pluviaux.

3.1.2 Réseau d'égouts pluviaux 1 (bassin versant)

Le deuxième site est un réseau d'égouts pluviaux dont l'affluent se déverse en amont du ruisseau 1 (**Fig. 3.3**). Ce réseau forme un bassin versant, puisque dans cette zone géographique toute l'eau de surface est dirigée vers un point commun appelé l'exutoire, situé en amont du ruisseau 1. Ce bassin pourrait être la source de la contamination du ruisseau 1. Onze points d'échantillonnages correspondant à des points d'accès aux conduites d'égouts pluviaux ont été sélectionnés sur ce bassin versant. Douze échantillons ont été prélevés la même journée dans chacun des puits d'accès, l'échantillonnage ayant été effectué par un organisme municipal.

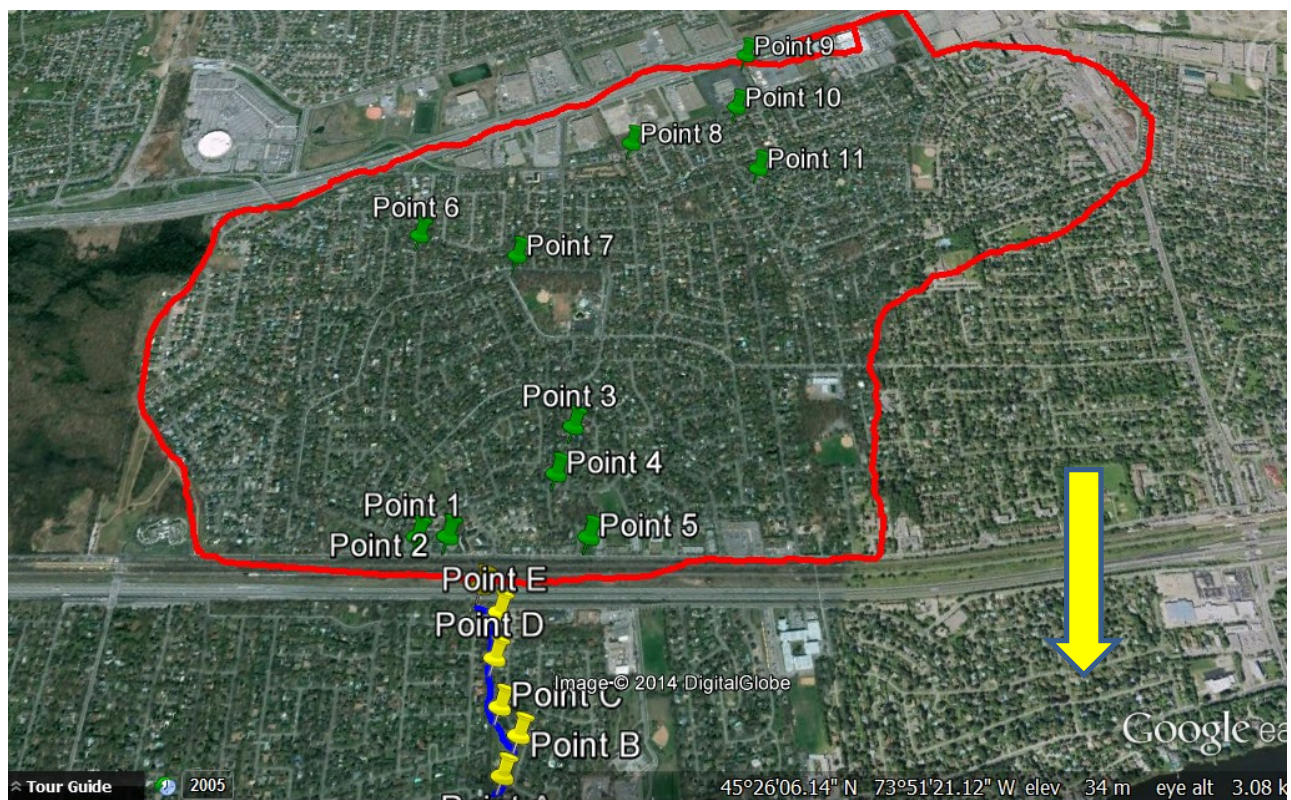


Figure 3.3 Réseau d'égouts pluviaux 1 (contour rouge) situé en amont du ruisseau 1 (ligne bleue) et localisation des sites échantillonnés (points verts) ainsi que la direction de l'écoulement (flèche jaune)

(adapté de Google Maps, <http://maps.google.ca>)

3.1.3 Réseau d'égouts pluviaux 2 (bassin versant)

Comme pour le réseau d'égouts pluviaux 1, ce réseau forme un bassin versant. Ce site n'avait jamais été échantillonné auparavant et a été échantillonné 27 fois sur une période de 3 jours, de façon aléatoire, par un organisme municipal afin d'obtenir de l'information sur une contamination possible de ce réseau (**Fig 3.4**).

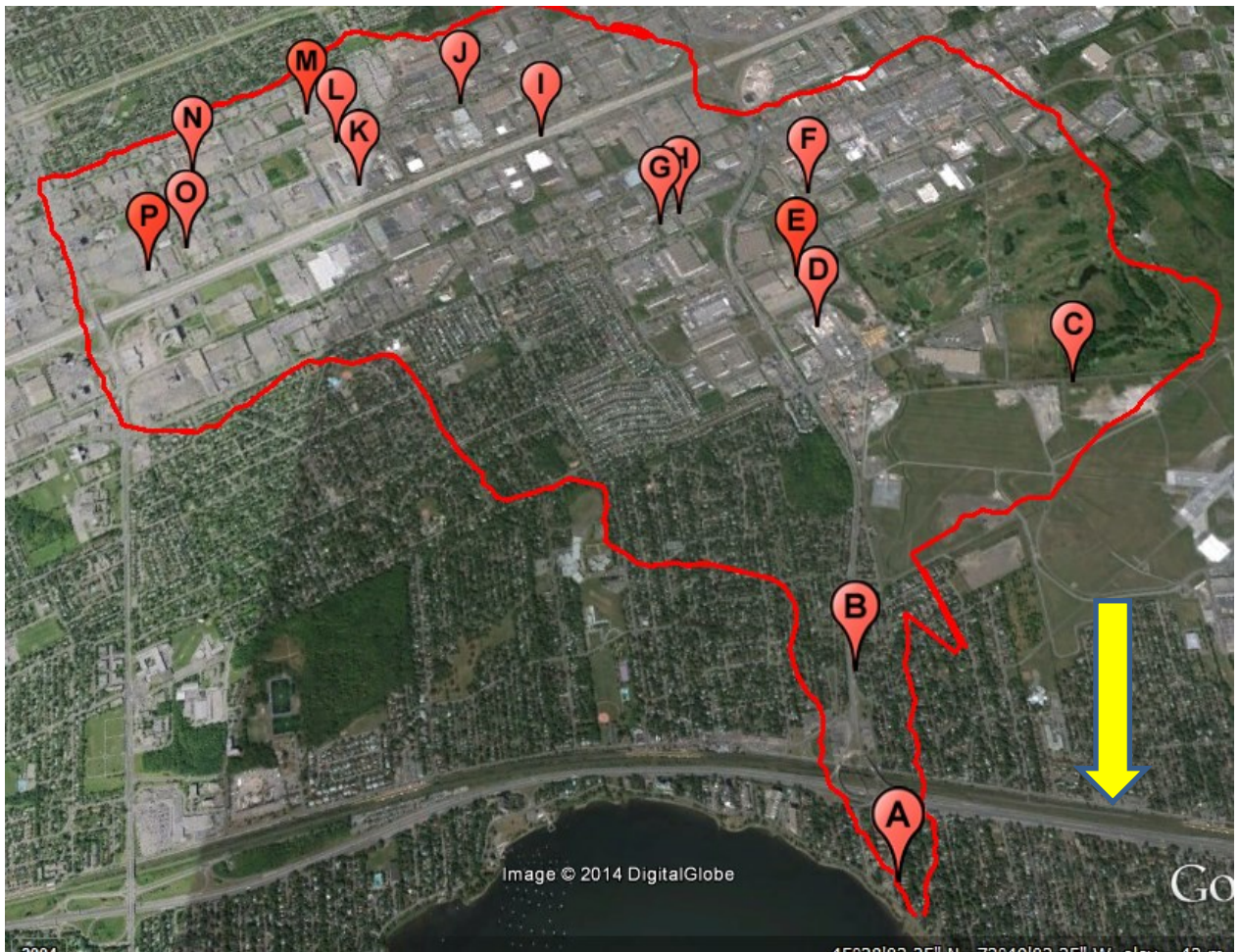


Figure 3.4 Réseau d'égouts pluviaux 2 (contour rouge) avec les sites échantillonnés (points rouges) et la direction de l'écoulement (flèche jaune)
(adapté de Google Maps, <http://maps.google.ca>)

3.1.4 Ruisseau 2

Comme pour le ruisseau 1, le ruisseau 2 est situé dans un quartier résidentiel et reçoit de l'eau pluviale. Une contamination fécale avait été observée et les raccordements inversés identifiés comme en étant la source par un organisme municipal. Quinze échantillons à différents points au long du ruisseau ont été prélevés en temps sec (Fig. 3.5).

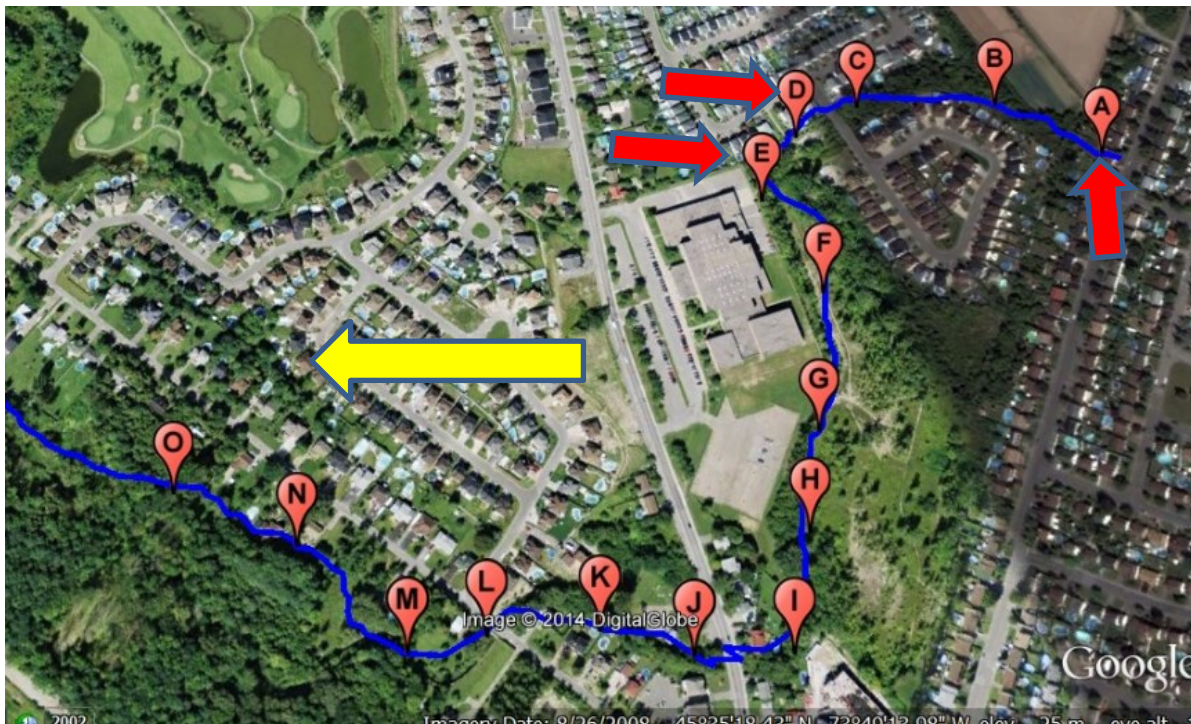


Figure 3.5 Ruisseau 2 avec les sites échantillonnés (points rouges) ainsi que les exutoires des égouts pluviaux (flèches rouges) et la direction de l'écoulement (flèche jaune)
(adapté de Google Maps, <http://maps.google.ca>)

3.1.5 Canal 1

Le canal 1 est un canal artificiel de 8250 m dans une zone urbaine qui alimente en eau deux stations de traitement des eaux potables d'une municipalité (Guérineau *et al.*, 2014). En comparaison avec les autres sites échantillonnés, l'eau de ce canal entre dans la municipalité alors que l'eau des autres sites est évacuée. Étant donné que ce canal est une source d'eau potable, il est clôturé pour éviter la présence d'activité humaine à proximité et ne devrait pas être contaminé. Par contre, les animaux y ont accès et le canal est situé parallèlement avec plusieurs égouts sanitaires et pluviaux qui pourraient s'écouler dans le canal. Un échantillonnage effectué en 2011 avait démontré que certains endroits avaient un niveau élevé d'*E. coli*. Quatre-vingt-douze échantillons ont été reçus pendant les étés 2012 et 2013.

3.2 Analyse des échantillons

3.2.1 Échantillonnage

L'échantillonnage des cours d'eau sur le territoire de la grande région de Montréal a été organisé et effectué par l'École Polytechnique de Montréal avec l'aide d'un organisme municipal pendant les étés 2012 et 2013. Généralement, un volume d'un litre d'eau a été prélevé à différents points géographiques des cinq sites dans des bouteilles de polypropylène (Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, É.-U.) préalablement lavées et stérilisées. Des échantillons de sédiments ont aussi été récoltés. Tous les échantillons ont été conservés au froid dans des glacières jusqu'à la réception à l'INRS-Institut Armand-Frappier, où ils ont été immédiatement transférés dans des bacs de glace jusqu'à la filtration.

3.2.2 Filtration et culottage des échantillons

Un volume de 500 mL d'eau par échantillons a été filtré sous vide sur filtres en cellulose de 0.45-µm (Milipore, Billerica, MA, É.-U.), tel que démontré dans la figure 3.6. Dans le cas d'échantillons turbides, un volume plus faible (250 mL, 100 mL) a été filtré et les volumes ont été pris en considération lors des évaluations. Le filtre a par la suite été transféré dans un tube Lysing Matrix A du kit FastDNA® SPIN-Kit (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, É.-U.) qui contient une sphère de céramique et des grenats afin de permettre le déchiquetage du filtre. Un mL de tampon de lyse (CLS-TC lysis buffer du kit FastDNA® SPIN-Kit) a été ajouté au tube afin de

préserver l'ADN, et les tubes ont été entreposés à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN. Pour les échantillons de sédiments, 2.0 mL de sédiments ont été placés dans un tube vissable et centrifugé à 16 000 g pendant 1 minute. Le surnageant a été jeté et un 2 mL additionnel a été centrifugé à 16 000 g pendant 1 minute pour un total de 4 mL par échantillons de sédiments.

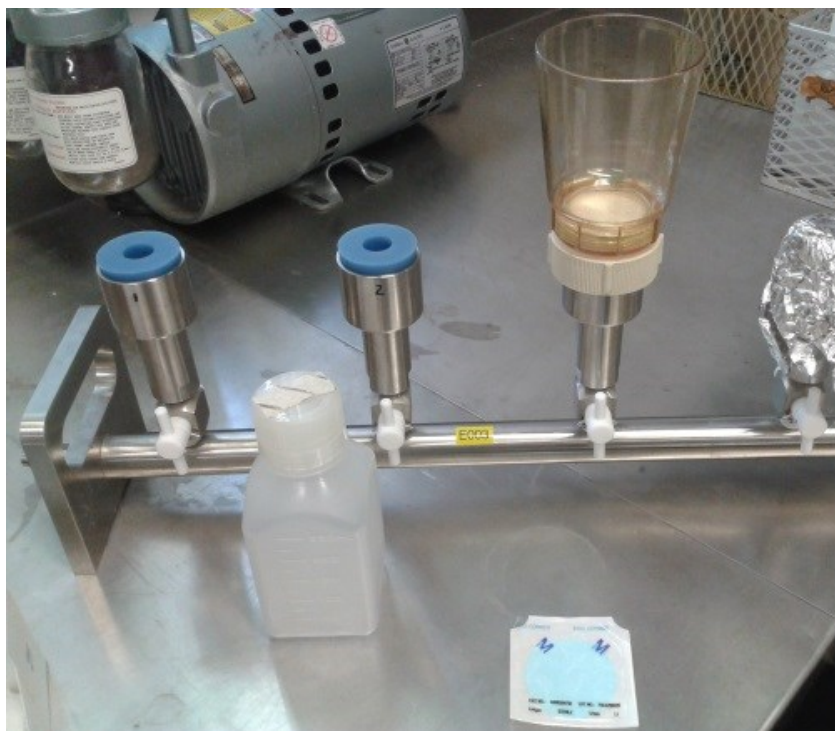


Figure 3.6 Matériel pour la filtration des échantillons

3.2.3 Extraction de l'ADN

Les tubes Lysing Matrix A contenant les filtres et le tampon de lyse ont été décongelés et les étapes du protocole du FastDNA™ SPIN KIT du fabricant ont été suivies jusqu'à l'obtention de l'ADN pur. Premièrement, les filtres ont été homogénéisés avec l'homogénéisateur mécanique Fast prep 24 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, É.-U.). Les lysats ont ensuite été centrifugés et les surnageants ont été transférés dans un tube de 2 mL. Une solution de silice qui lie l'ADN a ensuite été ajoutée aux tubes avant d'être soumise à une agitation vigoureuse permettant d'homogénéiser le mélange. Le contenu du tube a ensuite été transféré dans une colonne avec filtre et a été centrifugé à 16 000 g avec la centrifugeuse Bifuge pico (Heraeus, Hanau, Allemagne). Le culot du tube contenant l'ADN a été rincé avec une solution d'éthanol pour finalement être élué dans 100 µL d'eau nano pure. Pour les échantillons de sédiments, 200

mg de grenats ont été ajoutés à chaque tube de culot de sédiments avant l'extraction de l'ADN. Pour visualiser l'ADN, 5 µL du produit d'extraction a été migré par électrophorèse sur gel d'agarose 1% à 80 V pendant environ 50 minutes. Le gel a été incubé dans une solution de bromure d'éthidium afin de révéler les bandes qui ont été visualisées sous rayons UV avec l'appareil Alphamager 3400 (proteinsimple, Santa Clara, CA É.-U.). L'ADN a ensuite été quantifié par spectrophotométrie au Nanodrop1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, É.-U.) et les tubes ont été entreposés à -20°C pour l'entreposage à long terme.

3.2.4 Amplification du gène ribosomal 16s bactériens par PCR

Afin de tester la présence d'inhibiteurs dans les échantillons d'ADN, une réaction PCR universelle a été effectuée en ciblant le gène ribosomal 16S avec les amorces 27f-YM et PH (**Tableau 3.1**). Une préparation de PCR a été préparée contenant 200 µM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.) 0,4 µg/µl de BSA (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 0,625 unité de Taq polymérase (New England Biolabs, Ipswich, MA, É.-U.) tampon thermopol 1X, 0,2 pmoles/réaction d'amorces forward pA-27f-YM et reverse PH, et 1 µL d'ADN de l'échantillon (5 µL d'ADN dilué 1/5) et complétée avec de l'eau ultra stérile à un volume final de 25 µL. Les réactions ont été effectuées avec l'appareil GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster city, CA, É.-U.) au moyen du programme suivant : 94°C pour 5 minutes, 55°C pour 5 minutes, 30 cycles de : <72°C pour 45 secondes, 94°C pour 45 secondes, 55°C 45 secondes>, 72°C pour 10 minutes. De l'eau milliQ stérile et de l'ADN extrait de l'influent d'une station d'épuration d'eaux usées ont été utilisés comme contrôles négatif et positif respectivement. Les produits de PCR ont été migrés par électrophorèse sur gel 1,5% et le gel a été incubé dans une solution de bromure d'éthidium et les bandes ont été visualisées sous rayons UV avec l'appareil Alphamager (proteinsimple, Santa Clara, CA É.-U.). En l'absence de signal (bande à 1400pb), ce qui peut indiquer une présence d'inhibiteurs, une dilution de l'échantillon ou une quantité plus élevée d'ADN a été utilisé jusqu'à l'obtention de signal.

3.3 Amplification de marqueurs de contamination fécale

3.3.1 Amplification de l'ADN mitochondrial humain

Pour déterminer l'absence ou présence de contamination fécale humaine dans les échantillons, une amplification en niche (nested) utilisant des amorces spécifiques à l'ADN

mitochondrial humain développées par Kortbaoui *et al.* (2009) a été effectuée. Une première réaction PCR avec l'ADN des échantillons a été effectuée suivie d'une deuxième réaction en utilisant le produit de PCR de la première réaction comme matrice. Cette stratégie permet d'obtenir une meilleure sensibilité par rapport à l'ADN cible. Pour la première réaction, une préparation de PCR a été préparée contenant 200 µM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 0,4 µg/µl de BSA (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 0,625 unité de Taq polymérase (New England Biolabs, Ipswich, MA, É.-U.), tampon Thermopol 1X, 0,2 pmoles/réaction d'amorces forward Humito3-G et reverse Humito3-D (**Tableau 3.1**) et 1 µL d'ADN (5 µL d'ADN dilué 1/5) de l'échantillon, complétée avec de l'eau ultra stérile à un volume final de 25 µL. Les réactions ont été effectuées avec l'appareil GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, É.-U.) au moyen du programme suivant : 94°C pour 5 minutes, 55°C pour 5 minutes, 35 cycles de : <72°C pour 1 minute, 94°C pour 40 secondes, 55°C pour 45 secondes>, 72°C pour 10 minutes. Un µL de la première réaction PCR a été transféré dans une deuxième réaction PCR contenant 200 µM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 0,625 unité de Taq polymérase (New England Biolabs, Ipswich, MA, É.-U.), 0,2 pmoles/réaction d'amorces forward HumitoN3-G et reverse HumitoN3-D (**Tableau 3.1**), complétée avec de l'eau ultra stérile à un volume final de 25 µL. Le même programme PCR a été utilisé pour cette deuxième réaction. De l'eau milliQ et de l'ADN total de cellule humaine ont été utilisés comme contrôles négatif et positif respectivement. Les produits de PCR de la deuxième réaction ont été migrés par électrophorèse sur gel 1,5% et le gel a été incubé dans une solution de bromure d'éthidium et les bandes ont été visualisées sous rayons UV avec l'appareil AlphaMager (ProteinSimple, Santa Clara, CA, É.-U.). Un échantillon a été considéré comme étant positif pour l'ADN mitochondrial humain si une bande à 651 pb était observée.

3.3.2 Amplification du marqueur 16S de *Bacteroides* HF183

Afin de déterminer la présence ou l'absence de contamination fécale dans les échantillons, un deuxième marqueur de contamination fécale a été utilisé, soit HF183 qui est le gène ARNr 16S d'une bactérie appartenant au genre bactérien *Bacteroides* qui est spécifique à l'intestin humain (Seurinck *et al.*, 2005). Une préparation de PCR a été préparée contenant 200 µM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 0,4 µg/µl de BSA (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 0,625 unité de Taq polymérase (New England Biolabs, Ipswich, MA, É.-U.), tampon Thermopol 1X, 0,2 pmoles/réaction d'amorces forward HF183F et reverse HF183R (**Tableau 3.1**), et 1 µL d'ADN de l'échantillon (5 µL d'ADN dilué 1/5), complétée avec de l'eau

ultra stérile à un volume final de 25 µL. Les réactions ont été effectuées avec l'appareil GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster city, CA, É.-U.) au moyen du programme suivant : 50°C pour 2 minutes, 95°C pour 10 minutes, 40 cycles de <95°C pour 15 secondes 60°C 1minute>, 72°C pour 10 minutes. De l'eau milliQ et de l'ADN extrait de l'influent d'une station d'épuration d'eaux usées ont été utilisés comme contrôles négatif et positif, respectivement. Les produits de PCR ont été migrés par électrophorèse sur gel 2,5% et le gel a été incubé dans une solution de bromure d'éthidium et les bandes ont été visualisées sous rayons UV avec l'appareil Alphascreen (proteinsimple, Santa Clara, CA, É.-U.). Un échantillon a été considéré comme étant positif pour HF183 si une bande à 83 pb était observée.

3.4 Quantification des marqueurs de contamination fécale

3.4.1 Génération d'amplicons et préparation de la courbe d'étalonnage

Les étalons d'ADN servant à la préparation de la courbe d'étalonnage pour la quantification en absolu de l'ADN mitochondrial humain et du marqueur 16S de *Bacteroides* HF183 spécifique à l'humain ont été préparés selon une stratégie similaire. Le protocole et les amorces pour l'ADN mitochondrial humain ont été développés par l'étudiante Minh Vuong chez le professeur Luke Masson (non publié) alors que le protocole utilisé pour le marqueur HF183 est décrit dans Seurinck *et al.* (2005).

Une première amplification est effectuée avec une paire d'amorces amplifiant un long fragment d'ADN. Les produits de PCR dilués sont utilisés comme étalons externes pour la PCR quantitative. Lors de la quantification, une deuxième paire d'amorces cible une région plus petite à l'intérieur du long fragment PCR (ainsi que pour l'ADN cible environnementale). Les amplicons d'ADN mitochondrial ont été générés en utilisant une préparation de PCR contenant 200 µM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 0,4 µg/µl de BSA (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 1,25 unité de Taq polymérase (New England Biolabs, Ipswich, MA, É.-U.), 0,2 pmoles/réaction d'amorces AHuF et AHuR (**Tableau 3.1**), tampon thermopol 1X et 5 µL d'ADN extrait d'une lignée cellulaire humaine (5 µL d'ADN dilué 1/5), complétée avec de l'eau ultra stérile à un volume final de 50 µL. Les réactions ont été effectuées avec l'appareil GeneAmp PCR System 2700 au moyen du programme suivant : 95°C pour 5 minutes, 55°C pour 5 minutes, 40 cycles de <72°C pour 45 secondes, 94°C pour 45 secondes, 55 °C pour 45 secondes>, 72°C pour 10 minutes. Les produits de PCR ont été concentrés par vacuum (speed-

vac) et migrés par électrophorèse sur gel d'agarose de 1%. Le gel a été incubé dans une solution de bromure d'éthidium et la bande de 735pb a été découpée. L'ADN a été extrait du gel en utilisant la trousse commerciale Wizard Gel PCR cleanup (Promega, Madison, WI, É.-U.).

Pour les amplicons du marqueur HF183, les amplicons ont été générés en utilisant une préparation de PCR contenant 200 μ M de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 0,4 μ g/ μ L de BSA (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 1,25 unité de Taq polymérase, 0,2 pmoles/réaction d'amorces HF183F et Bac708 (**Tableau 3.1**), tampon thermopol 1X et 5 μ L d'ADN extrait à partir d'influent d'une station d'épuration d'eaux usées complétée avec de l'eau ultra stérile à un volume final de 50 μ L. Les réactions ont été effectuées avec l'appareil GeneAmp PCR System 2700 au moyen du programme suivant : 95°C pour 5 minutes, 55°C pour 5 minutes, 40 cycles de <72°C pour 45 secondes, 94°C pour 45 secondes, 55 °C pour 45 secondes>, 72°C pour 10 minutes. Les produits de PCR ont été concentrés par vacuum et migrés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Le gel a été incubé dans une solution de bromure d'éthidium et la bande à 525pb a été découpée. L'ADN du gel a été extrait en utilisant la trousse Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, É.-U.).

Les amplicons ont été quantifiés à l'aide de la trousse Quant-it PicoGreen dsDNA Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), et ont été dilués afin d'avoir une dilution de 10^8 à 10^0 copies d'ADN préparées en aliquots et réservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

3.4.2 Quantification de l'ADN mitochondrial humain

Pour les échantillons qui étaient positifs à l'étape 3.3.1, l'ADN mitochondrial humain a été quantifié en utilisant la qPCR. Une préparation de PCR quantitative a été préparée contenant 0,2 pmoles/réaction d'amorces QMIHUF et QMIHUR (**Tableau 3.1**), les réactifs de la trousse Perfecta sybregreen fastmix 1 X (contient du SYBR green, Taq polymérase, tampon et dNTP), 1 μ L d'ADN de l'échantillon ou 1 μ L de l'étalon (5 μ L d'ADN dilué 1/5), complétée avec de l'eau ultra stérile à un volume final de 20 μ L. Les réactions ont été effectuées à l'aide de l'appareil Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Venlo, Limburg, Pays-Bas) au moyen du programme suivant : 95°C pour 10 minutes, 40 cycles de 94°C pour 30 secondes 55°C 1 minute et 72°C pour 1 minute. La détection du signal a été faite sur le "channel green" pendant la fin de l'élongation de 72°C pour 1 minute. Les paramètres du seuil de détection ont été laissés comme prédéfinis. L'efficacité de la réaction était considérée comme étant acceptable si elle était entre 90% et 110%. Tous les échantillons de références ainsi que les blancs ont été faits en triplicata; la valeur obtenue finale était la moyenne des trois répliques. Les valeurs obtenues sont en copie d'ADN mitochondrial/ μ L.

Afin d'obtenir une valeur en mL, les valeurs obtenues ont été multipliées par 100 (facteur de dilution lors de l'extraction de l'ADN) et divisées par le volume d'eau filtrée pour le filtre (généralement 500 mL). Les valeurs ont été ensuite multipliées par 100 afin d'obtenir des valeurs de copie d'ADN mitochondrial par 100 mL d'eau filtrée.

3.4.3 Quantification du marqueur 16s de *Bacteroides* HF183

Les échantillons qui étaient positifs à l'étape 3.3.2 ont été quantifiés pour le marqueur HF183 selon la même approche qu'avec l'ADN mitochondrial à l'étape 3.3.2. Les amplicons préparés à l'étape 3.3.1 ont été utilisés pour la courbe d'étalonnage d'ADN. Une préparation de PCR quantitative a été préparée contenant 0,2 pmoles/réaction d'amorces HF183F et HF183R (**Tableau 3.1**), les réactifs de la trousse Perfecta SYBR green fastmix 1 X (contient du SYBR green, Taq polymérase, tampon et dNTP), 1 µL d'ADN de l'échantillon ou 1 µL de l'étalon, complétée avec de l'eau ultra stérile à un volume final de 20 µL. Les réactions ont été effectuées à l'aide de l'appareil Corbett Life Science - Rotor-Gene 6000 au moyen du programme suivant : <95°C pour 15 minutes, 40 cycles de 94°C pour 45 secondes, 55°C 45 secondes> et 72°C pour 45 secondes. Les autres paramètres sont identiques à ceux de l'étape 3.3.2. Les valeurs ont été converties pour obtenir un taux final de copie d'HF183 par 100 mL d'eau filtrée.

3.5 Conception d'amorces et d'une sonde pour la détection de l'ADN mitochondrial du raton laveur et de l'humain

3.5.1 Conception d'amorces ciblant l'ADN mitochondrial du raton laveur (*Procyon lotor*)

L'ADN mitochondrial de raton laveur (source gene bank : AB297804.1) a été aligné avec l'ADN mitochondrial d'espèces autres (l'humain, bovin, ovin, porc, chien, etc.), en utilisant clustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Les régions divergentes de l'ADN mitochondrial du raton laveur ont été sélectionnées pour le développement des amorces. Les régions d'intérêts ont ensuite été analysées au moyen du programme Primer3 v.4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>) (REF voir le site). Les paramètres suivants ont été sélectionnés pour permettre d'obtenir la meilleure paire d'amorces en évitant les dimères d'amorces : amorces de 18-23 pb, Tm de 57-62°C, 0 pour les hybridations internes ainsi que homodimères et hétérodimères, longueur de l'amplicon de 100 pb à 900 pb. Les autres paramètres ont été

laissés comme prédéfinis. Pour permettre d'avoir une plus grande sélection d'amorces, certains paramètres ont parfois été modifiés pour être plus tolérants.

Une fois qu'une paire convenable a été trouvée, une recherche d'amorces qui amplifient à l'intérieur de l'amplicon généré par la première paire d'amorces (PCR en niche) en utilisant les mêmes paramètres a été effectuée au moyen du programme Primer 3. Si aucune paire d'amorces en niche convenable n'était trouvée, la recherche a été recommencée pour la première paire d'amorces. Une fois que les deux paires d'amorces convenables ont été trouvées, elles ont été alignées au moyen du programme Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) contre l'ADN mitochondrial du raton laveur pour vérifier leur hybridation à l'ADN matrice. Ensuite, les amorces ont été alignées contre de l'ADN d'espèces autres. Si l'alignement produit une hybridation majeure, c'est qu'il y a un risque d'amplification non spécifique autre que du raton laveur qui pourrait mener à des faux positifs à cause de la présence de matière fécale autre que celle du raton laveur dans l'eau. Les amorces qui ont été retenues sont les suivantes Rlav F : CCCTCCTCAAGCAGTAGTAATTC et Rlav R : CAGTGATTCATTCGTTACCTGCT pour la première amplification et nRlav F : TCCGTGACCGCTTTGAACTA et nRlav R : CTCTTAGGCCTACTATGGTTGTG pour l'amplification en niche. Ces amorces amplifient dans la région 12S ribosomal RNA-tRNA-Val-16S ribosomal RNA de l'ADN mitochondrial qui fait partie de la région M150 (Vuong *et al.*, 2013). De l'ADN de raton laveur extrait a été fourni par le professeur Luc Masson de l'Université de Montréal.

Les amorces ont premièrement été utilisées avec l'ADN de raton laveur. Une préparation de PCR a été préparée contenant 200 µM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 0,4 µg/µl de BSA (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 0,625 unité de Taq polymérase (New England Biolabs, Ipswich, MA, É.-U.), tampon thermopol 1X, 0,2 pmoles/réaction d'amorces Rlav F et Rlav R et 1 µL d'ADN (5 µL d'ADN dilué 1/5) de l'échantillon complété avec de l'eau ultra stérile à un volume final de 25 µL. Les réactions ont été effectuées avec l'appareil GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster city, CA, É.-U.) au moyen du programme suivant : 94°C pour 5 minutes, 55°C pour 5 minutes, 35 cycles de : <72°C pour 1 minute, 94°C pour 40 secondes, 55°C pour 45 secondes>, 72°C pour 10 minutes. Un µL de la première réaction PCR a été transféré dans une deuxième réaction PCR contenant 200 µM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 0,625 unité de Taq polymérase (New England Biolabs, Ipswich, MA, É.-U.), 0,2 pmoles/réaction d'amorces nRlav F et nRlav R, complétée avec de l'eau ultra stérile à un volume final de 25 µL. Le même programme PCR est utilisé pour cette deuxième réaction. Les produits de PCR de la deuxième réaction ont été migrés par

électrophorèse sur gel 1,5% et le gel a été incubé dans une solution de bromure d'éthidium et les bandes ont été visualisées sous rayons UV avec l'appareil Alphamager (proteinsimple, Santa Clara, CA É.-U.). Une bande a été observée à 880 pb pour la première réaction et à 534 pb pour la deuxième, ce qui correspond à la longueur des fragments théoriques et confirme l'utilité des amorces pour l'amplification de l'ADN mitochondrial du raton laveur. Les amorces ont ensuite été testées contre de l'ADN humain, bovin, porcin, ovin, poulet, autruche, goéland, cerf rouge, cheval, émeu, caille ainsi que de l'ADN extrait de l'influent d'une station d'épuration d'eaux usées pour vérifier la spécificité des amorces. Aucune amplification non spécifique n'a été décelée par électrophorèse.

3.5.2 Conception d'une sonde TaqMan pour la détection de l'ADN mitochondrial humain

La séquence contenue dans le produit de PCR issu des amorces QMIHUF et QMIHUR a été utilisée pour concevoir un oligonucléotide hydrolysant de type sonde TaqMan. Cette séquence (156 pb) a été analysée au moyen du programme Primer 3 v.4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>) et les paramètres suivants ont été sélectionnés pour trouver une sonde convenable sans dimère ou hétérodimère entre la sonde et les amorces. Certains paramètres ont dû être appliqués manuellement, notamment la sélection d'une sonde de courte taille (20-28 pb) étant donné qu'une sonde trop longue éloigne la molécule fluorescente de la molécule masquante (quencher), ce qui augmente le bruit de fond. Un autre critère qui a été important fut d'éviter le nucléotide G dans la première position 5' de la sonde, car ce nucléotide peut masquer le signal de plusieurs molécules fluorescentes. Les sondes hydrolysantes doivent généralement avoir un T_m de 8-10°C plus élevé que celui des amorces pour s'assurer d'avoir une forte hybridation entre la sonde hydrolysante et l'ADN matrice. Étant donné que nos amorces ont un T_m d'environ 60°C, une sonde convenable aurait dû avoir un T_m d'environ 68 °C. Comme pour la conception des d'amorces de raton laveur, certains paramètres ont été modifiés pour être plus tolérants et obtenir un plus grand nombre de sélections. La sonde suivante a été retenue : ACATGCAAGCATCCCCGTTCCAGT nommée tqmitoHu1. Le groupement fluorescent 6-FAM (6-carboxyfluorescein) a été sélectionné en 5' et le groupement masquant BHQ-1 (Black hole quencher-1) a été sélectionné en 3'. La sonde a été commandée par Alpha DNA (Montréal, Québec, Canada) et a été mise à l'essai avec de l'ADN extrait d'une lignée cellulaire humaine.

Une préparation de PCR quantitative a été préparée contenant 0,2 pmoles/réaction d'amorces QMIHUF et QMIHUR, 0,1 pmoles/réaction de la sonde TaqMan tqmitoHu1, 200 µM de dNTP (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 0,4 µg/µl de BSA (Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.), 0,625 unité de Taq hotstart polymérase (New England Biolabs, Ipswich, MA, É.-U.), tampon thermopol 1X 1 µL d'ADN mitochondrial ou un µL de l'étalon (5 µL d'ADN dilué 1/5), complétée avec de l'eau ultra stérile à un volume final de 25 µL. Les réactions ont été effectuées à l'aide de l'appareil Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Venlo, Limburg, Pays-Bas) au moyen du programme suivant : 94°C pour 5 minutes, 40 cycles de 94°C pour 30 secondes 55°C 1 minute et 65°C pour 1 minute. La détection du signal a été faite sur le "channel green" pendant la fin de l'élongation de 65°C pour 1 minute. Les paramètres de détection ont été ajustés pour augmenter l'intensité du signal fluorescent qui est plus faible chez les sondes TaqMan.

3.6 Analyses statistiques

3.6.1 Analyse de la corrélation entre le marqueur *Bacteroides* HF183 et l'ADN mitochondrial humain

Afin de déterminer si l'ADN mitochondrial était un marqueur de contamination fécale aussi performant que le marqueur *Bacteroides* HF183, nous avons tenté d'établir une corrélation entre ces deux marqueurs à partir des résultats obtenus de la qPCR. L'analyse a été effectuée en utilisant le logiciel statistique Graphpad Prism 6 (La Jolla, CA, USA) et en sélectionnant le coefficient de corrélation Spearman.

3.6.2 Analyse de l'origine de la contamination fécale du ruisseau 1

Afin de déterminer l'origine de la contamination fécale pour le ruisseau 1, une analyse statistique de la variation du niveau des marqueurs de contamination fécale en fonction de la location géographique de l'échantillon a été effectuée. Le logiciel statistique Graphpad Prism 6 (La Jolla, CA, USA) a été utilisé en sélectionnant l'analyse ANOVA à un facteur.

Tableau 3.1 Amorces utilisées dans cette étude

Cible	Amorces	Séquence 5'-3'	T°C hybridation	Amplicon (bp)	Références
<i>ARNr 16S</i> (PCR universelle)	pA-27f-YM PH	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	55	~1,500	(Frank <i>et al.</i> , 2008)
<i>NADH-dehydrogenase subunit 5</i> (PCR humain mitochondrial)	Humito3-G Humito3-D	CCCAACCCGTCATCTACTCT AGGGTGTTAGTCATGTTAGC	55	718	(Kortbaoui <i>et al.</i> , 2009)
<i>NADH-dehydrogenase subunit 5</i> (PCR humain mitochondrial)	HumitoN3-D HumitoN3-G	CTACTCTACCATCTTTGCAGG CGTGGTGCTGGAGTTTAAGTTG	55	651	(Kortbaoui <i>et al.</i> , 2009)
<i>ARNr 16s Bacteroides</i> HF183 (PCR et qPCR spécifique à l'humain)	HF183F HF183R	ATCATGAGTTCACATGTCCG TACCCCGCTACTATCTAATG	60	82	(Seurinck <i>et al.</i> , 2005)
<i>ARNr 12s</i> (qPCR humain mitochondrial)	QMI HuF QMI HuR	AATGTTTAGACGGGCTCACATC A CTGCGTGCTTGATGCTTGTC	55	156	(non publié)
<i>ARNr 12s</i> (amplicons humain pour qPCR)	AHuF AHuR	CCACAGCACTTAAACACATC GCTATTGTGTGTTTCAGATATGT	55	735	(non publié)
<i>ARNr 16s bacteroides</i> HF183 (amplicons <i>Bacteroides</i> pour qPCR)	HF183F Bac708	ATCATGAGTTCACATGTCCG CAATCGGAGTTCTTCGTG	55	525	(Bernhard <i>et al.</i> , 2000)
<i>ARNr 12s</i> (PCR raton laveur mitochondrial)	Rlav F Rlav R	CCCTCCTCAAGCAGTAGTAATT C CAGTGATTCATTGTTACCTGC T	55	880	(non publié)
<i>ARNr 12s</i> (PCR raton laveur mitochondrial)	nRlav F nRlav R	TCCGTGACCGCTTTGAACTA CTCTTAGGCCTACTATGGTTGT G	55	534	(non publié)

4 RÉSULTATS

4.1 Échantillonnage et analyse des échantillons

4.1.1 Échantillonnage pour les étés 2012 et 2013

Pour les années 2012 et 2013, 279 échantillons ont été reçus à l'INRS-Institut Armand-Frappier (**Tableau 4.1**). L'échantillonnage a été effectué selon la problématique des différents sites sélectionnés par l'école Polytechnique de Montréal.

Tableau 4.1 Échantillons reçus pour chaque site

Site	Date	Nombre d'échantillons
Ruisseau 1	Juillet 2012	34
Sédiments ruisseau 1	Juillet 2012	18
Réseau d'égouts pluviaux 1	Août 2012	11
Réseau d'égouts pluviaux 2	Août - septembre 2012	27
Ruisseau 2	Juin – août 2013	41
Canal 1	Juin-juillet 2012, juin 2013	126
Sédiments ruisseau 1	Juillet 2012	28
Total		279

4.1.2 Extraction d'ADN et test d'inhibitions

L'ADN a été extrait à partir de tous les échantillons d'eaux et de sédiments pour faire l'analyse de la contamination fécale. Tous les échantillons d'ADN ont été quantifiés et les échantillons ont été visualisés sur gel d'agarose pour vérifier l'intégrité de l'ADN. La figure 4.1 illustre un exemple représentatif de l'état de l'ADN extrait. Tous les ADN ont produit un profil de traînée de faible à haut poids moléculaire et ont été jugés comme étant de qualité suffisante pour les analyses par PCR. La quantité d'ADN par échantillon variait de 30 à 250 ng/μL pour un total de 3 à 25 μg par volume filtré (environ 500 mL). Un test d'amplification par PCR des gènes de l'ARNr 16S a été effectué pour tous les échantillons d'ADN extraits afin de tester la présence d'inhibiteurs. Aucune inhibition majeure n'a été observée pour les échantillons filtrés (**Fig. 4.2**).

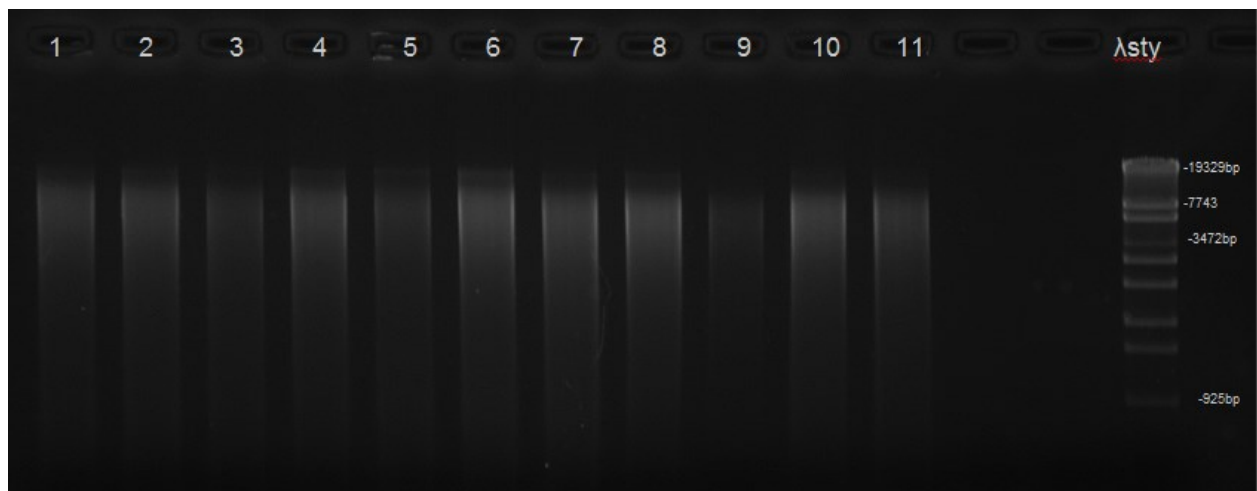


Figure 4.1 Exemple de résultats obtenus pour la visualisation des échantillons d'ADN. Échantillons d'ADN du réseau d'égouts pluviaux 1 (puits 1-11) et le marqueur moléculaire Lamda sty I (Gene on, Allemagne) (puits 14). Migrés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,0%.

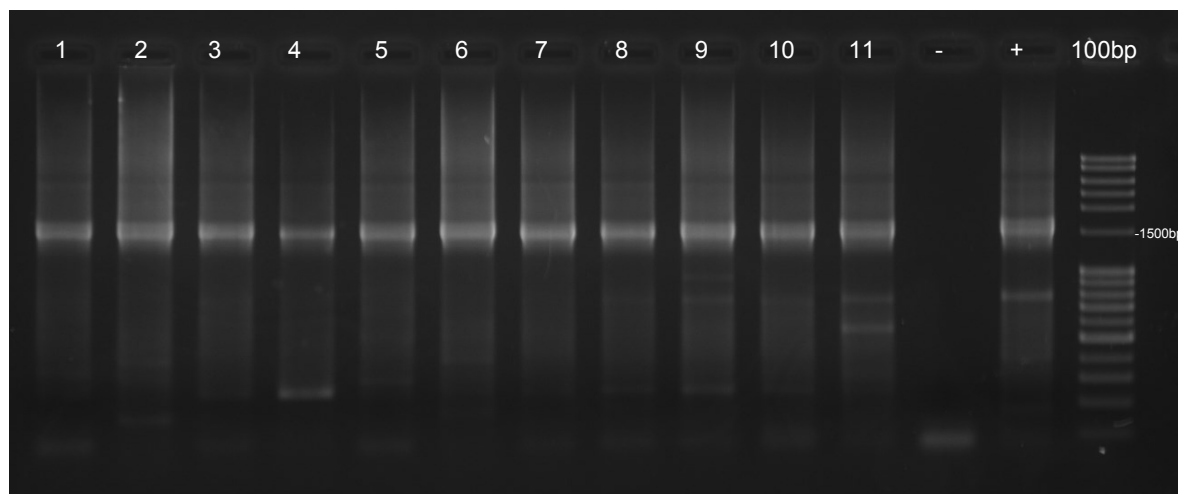
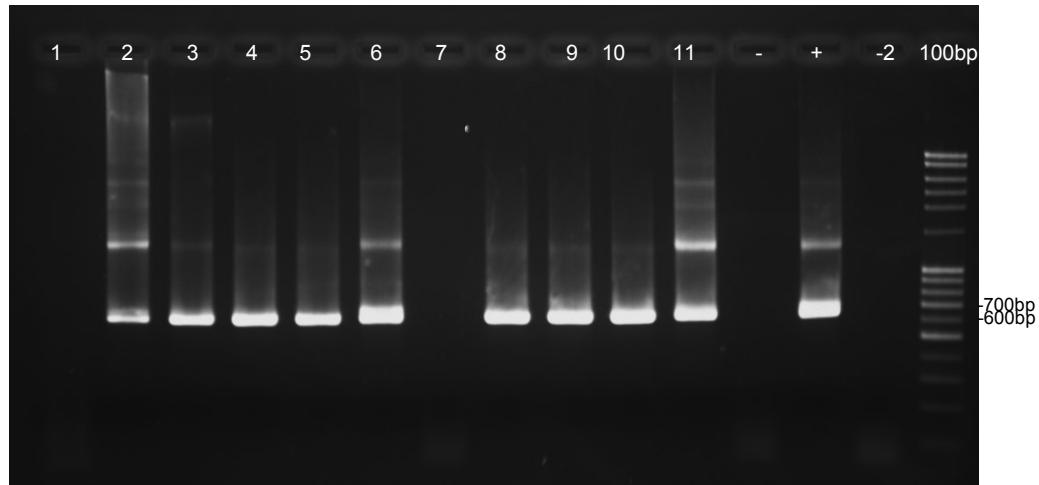


Figure 4.2 Exemple de résultats pour le test d'amplifications par PCR du gène de l'ARNr 16S. Échantillons du réseau d'égouts pluviaux 1 (puits 1-11), les contrôles négatif et positif (puits 12-13) et le marqueur moléculaire midrange plus 100bp-5000bp (Fisher Scientific, Waltham, MA, É.-U.) (puits 14) après migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%. La présence de bandes à 1,500bp dans les échantillons démontre qu'ils sont libres de molécules inhibitrices.

4.1.3 Détection des marqueurs de contamination fécale HF183 et ADN mitochondrial dans les échantillons d'eau et de sédiments

À partir de l'ADN extrait, des réactions PCR ont été effectuées afin de déterminer quels échantillons étaient positifs pour la contamination fécale humaine, avec les amorces spécifiques à l'ADN mitochondrial (**Fig. 4.3A**) et à *Bacteroides* Hf183 (**Fig 4.3B**). Des amplicons de longueur 651 pb pour le marqueur mitochondrial et de 83 bp pour celui de Hf183 ont été obtenus tel qu'attendu. Les échantillons positifs pour l'ADN mitochondrial ont parfois produit une double bande comme dans le puits 2 de la figure 4.3A. Étant donné que cette double bande est à un poids moléculaire plus élevé que la bande d'intérêt et qu'elle n'était pas présente dans les échantillons négatifs, il a été jugé que cette bande était un artefact de PCR en niche et n'avait pas d'incidence sur la détection par PCR. Au total, cent-treize échantillons ont été identifiés comme étant positifs à l'étape 4.1.3 pour le marqueur mitochondrial et quatre-vingt-seize étaient positifs à l'étape 4.1.4 pour Hf183.

A



B

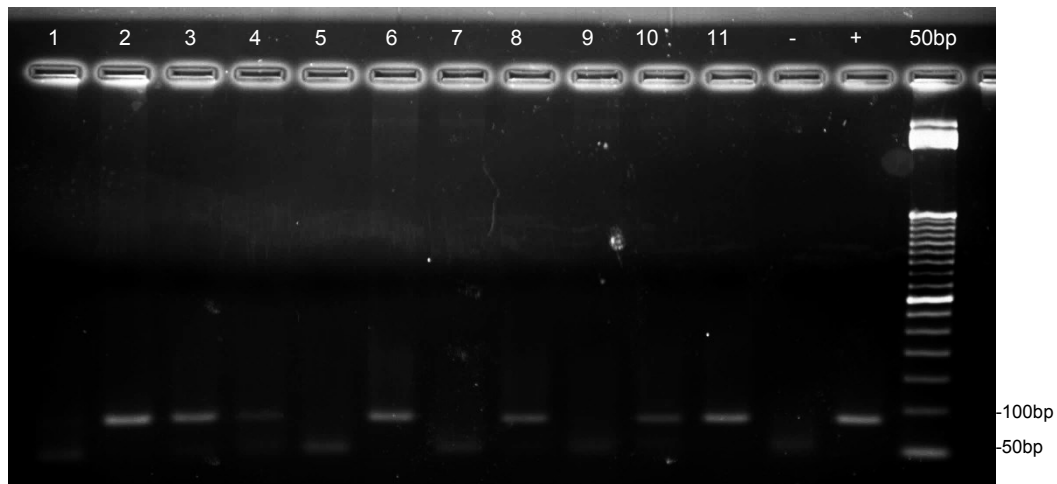


Figure 4.3 Exemple de résultats d'électrophorèse pour la détection des marqueurs de contamination fécale humaine mitochondrial par électrophorèse.

Détection de l'ADN mitochondrial humain (A) avec les échantillons du réseau d'égouts pluviaux 1 sur gel d'agarose 1,5% dans les puits 1-11 (2-6 et 8-9 positifs) et les contrôles négatifs et positifs dans les puits 12-14 ainsi que le marqueur moléculaire mid range plus 100bp-5000bp (Fisher Scientific, Waltham, MA, É.-U.) (puits 15). Détection du marqueur HF183 (B) avec les échantillons du réseau d'égouts pluviaux 1 sur gel d'agarose 2,5% dans les puits 1-11 (2-4, 6, 8, 10-11 positifs) et les contrôles négatifs et positifs dans les puits 12-13 ainsi que le marqueur moléculaire track it 50 bp dans le puits 14 (Life Techonologies, Carlsbad, CA, É.-U.).

4.1.4 Quantification des marqueurs de contamination fécale HF183 et ADN mitochondrial dans les échantillons d'eau

Les échantillons positifs à l'étape 4.1.3 ont été analysés par qPCR pour quantifier le niveau des marqueurs. Les échantillons de sédiments n'ont donné aucun résultat quantifiable, et ce, malgré une purification supplémentaire de l'ADN. Les échantillons de sédiments ont donc été exclus de l'analyse de corrélation entre le marqueur mitochondrial et Hf183. Étant donné que le marqueur HF183 n'a jamais été détecté dans le canal 1 et que ce site a une problématique particulière, il a été exclu de l'analyse de corrélation.

4.1.4.1 Analyse de l'origine de la contamination fécale du ruisseau 1

Une étude de variation des niveaux des marqueurs de contamination fécale en fonction des stations échantillonnées a été effectuée afin de déterminer l'origine de la contamination fécale pour le ruisseau 1 (**Tableau 4.2**). Les deux marqueurs ont été détectés dans tous les échantillons reçus au laboratoire pour ce ruisseau. Les niveaux des 3 marqueurs de contamination fécale inclus dans cette analyse sont très élevés pour toutes les stations échantillonnées, ce qui démontre une contamination fécale d'origine humaine. Une analyse statistique par ANOVA a été effectuée pour déterminer la provenance de la contamination. Aucune variation significative du niveau des 3 marqueurs de contamination fécale n'a été observée, ce qui peut être attribué à une contamination en amont du ruisseau et non aux exutoires qui se déversent dans le ruisseau (réseau d'égouts pluviaux 1).

Tableau 4.2 Résultats de la moyenne du niveau des marqueurs de contamination fécale d'origine humaine ainsi que du dénombrement d'*E. coli* pour le ruisseau 1 en fonction des stations échantillonnées (n=6 pour chaque stations).

Station	ADNmt humain cp/100 mL	HF183 Humain <i>Bacteroides</i>	<i>E. coli</i> (NPP/100 mL) ^a
Amont	3.51E+02	6.98E+03	1700
Point A	5.10E+02	2.20E+04	2500
Point B	5.38E+02	2.40E+04	3400
Point C	7.76E+02	5.55E+04	4400
Point D	1.14E+03	6.03E+04	3100
Point E	7.57E+02	4.07E+04	2700

a: effectué par l'École polytechnique de Montréal

4.1.4.2 Analyse de la contamination fécale du réseau d'égouts pluviaux 1

Dix des onze stations échantillonnées ont été positives pour les deux marqueurs de contamination fécale (**Tableau 4.3**), soit 91% des échantillons. À partir des échantillons positifs, un niveau élevé des marqueurs de contamination fécale ainsi que du nombre d'*E. coli* a été détecté pour plusieurs points du réseau d'égouts pluviaux 1 qui est en amont du ruisseau 1.

Tableau 4.3 Résultats de la détection et de la quantification de la contamination fécale pour deux marqueurs de contamination fécale d'origine humaine ainsi que du dénombrement d'*E. coli* pour le réseau d'égouts pluviaux 1 en fonction des stations échantillonnées.

Station	ADNmt humain PCR en niche	ADNmt humain cp/100 mL	HF183 Humain <i>Bacteroides</i>	HF183 <i>Bacteroides</i> cp/100 mL	<i>E. coli</i> (NPP/100 mL) ^a
1	positif	2.07E+02	positif	4.93E+04	3300
2	positif	2.39E+02	positif	1.16E+04	3600
3	positif	1.00E+02	positif	2.09E+03	1100
4	positif	1.00E+02	positif	1.00E+02	120000
5	positif	1.00E+02	positif	3.37E+02	1
6	positif	1.14E+03	positif	2.43E+05	14000
7	positif	1.00E+02	positif	1.56E+02	1400
8	positif	3.73E+03	positif	1.55E+06	15000
9	négatif	N/A	négatif	N/A	21
10	positif	4.85E+04	positif	1.94E+07	2400
11	positif	1.00E+05	positif	1.70E+08	2400

a: effectué à l'École Polytechnique de Montréal

N/A : qPCR non effectuée car négatif pour PCR

4.1.4.3 Analyse de la contamination fécale du réseau d'égouts pluviaux 2

Pour le réseau d'égouts pluviaux 2, plusieurs points ont été positifs pour les marqueurs de contamination fécale. 69% ont été positifs pour l'ADN mitochondrial et 50% pour HF183. Certains points avaient un niveau de contamination élevé, ce qui démontre une contamination des égouts sanitaires dans les conduites pluviales (**Tableau 4.4**). Le décompte d'*E. coli* n'a pas été effectué pour ce réseau d'égouts pluviaux.

Tableau 4.4 Résultats de la détection et de la quantification de la contamination fécale pour deux marqueurs de contamination fécale d'origine humaine ainsi que du dénombrement d'*E. coli* pour le réseau d'égouts pluviaux 2 en fonction des stations échantillonnées.

Station	ADNmt humain PCR en niche	ADNmt humain cp/100 mL	HF183 Humain <i>Bacteroides</i>	HF183 <i>Bacteroides</i> cp/100 mL
1	positif	1,19E+03	positif	5,92E+04
2	négatif	N/A	positif	6,40E+04
3	positif	1,00E+02	négatif	N/A
4	positif	6,05E+03	positif	2,09E+07
5	négatif	N/A	négatif	N/A
6	positif	N/A	positif	1,00E+02
7	négatif	N/A	négatif	N/A
8	positif	1,00E+02	négatif	N/A
9	positif	1,14E+03	négatif	N/A
10	positif	1,00E+02	positif	4,38E+03
11	positif	9,42E+02	positif	1,09E+05
12	positif	1,00E+02	positif	1,00E+02
13	négatif	N/A	négatif	N/A
14	positif	6,34E+04	positif	4,98E+05
15	positif	1,70E+02	négatif	N/A
16	négatif	N/A	négatif	N/A

N/A : qPCR non effectuée car négatif pour PCR

4.1.4.4 Analyse de la contamination fécale du ruisseau 2

Pour le ruisseau 2, les deux marqueurs ont été détectés dans presque tous les échantillons reçus, ce qui peut être expliqué par la contamination des égouts sanitaires à travers le ruisseau ainsi qu'en amont du ruisseau (**Tableau 4.5**). 93% des échantillons étaient positifs pour les deux marqueurs. Le décompte d'*E. coli* n'a pas été effectué pour ce réseau d'égouts pluviaux.

Tableau 4.5 Résultats de la détection et de la quantification de la contamination fécale pour deux marqueurs de contamination fécale d'origine pour le ruisseau 2 en fonction des stations échantillonnées.

Station	ADNmt humain PCR en niche	ADNmt humain cp/100 mL	HF183 Humain <i>Bacteroides</i>	HF183 <i>Bacteroides</i> cp/100 mL
1	positif	9.28E+02	positif	5.56E+04
2	positif	1.11E+03	positif	3.32E+04
3	positif	1.93E+02	positif	1.46E+03
4	positif	9.38E+02	positif	1.06E+04
5	positif	2.30E+02	positif	5.52E+03
6	positif	Sous LDQ	positif	2.06E+04
7	positif	4.76E+02	positif	1.08E+03
8	positif	3.42E+02	positif	9.28E+03
9	négatif	N/A	négatif	N/A
10	positif	1.28E+02	positif	1.90E+02
11	positif	1.22E+02	positif	2.36E+02
12	positif	6.64E+02	positif	7.56E+02
13	positif	1.64E+05	positif	1.76E+07
14	positif	6.34E+02	positif	2.46E+02
15	positif	Sous LDQ	positif	2.96E+03

N/A : qPCR non effectuée car négatif pour PCR

Sous LDQ : Sous limite de quantification

4.1.4.5 Analyse du canal 1

Pour des raisons de confidentialité, l'emplacement des stations d'échantillonnage du canal n'a pas été dévoilé. De l'ADN mitochondrial a été détecté dans plus du tiers des échantillons pour l'ADN mitochondrial (**Tableau 4.6**). Par contre, la quantification a donné une quantité très faible d'ADN mitochondrial où seuls 10 échantillons ont pu être quantifiés. Le marqueur *Bacteroides* HF183 n'a pas été détecté dans aucun des échantillons du canal et donc n'a pas été quantifié.

Tableau 4.6 Résultats de la détection et de la quantification des marqueurs de contamination fécale dans le canal 1

# échantillons	ADNmt humain PCR en niche	ADNmt humain cp/100 mL moyenne	Positif HF183 (A)	HF183 cp/100 mL moyenne
126	48 (38%)	4,15E+02 (10)	Négatif	N/A

N/A : Qpcr non effectuée car négatif pour PCR

4.1.5 Analyse de corrélation entre le marqueur HF183 et l'ADN mitochondrial

Une étude de corrélation entre le marqueur HF183 et l'ADN mitochondrial a été effectuée à partir des résultats de la qPCR de 114 échantillons d'eau positifs. Une transformation logarithmique a été utilisée étant donné la distribution non normale des données. Certains échantillons identifiés comme étant positifs par PCR en niche n'ont pas donné de résultats quantifiables probablement parce que le niveau des marqueurs était sous le niveau de détection de la méthode de qPCR. La valeur limite de la quantification a donc été attribuée à ces échantillons. Premièrement, une valeur de $R^2 = 0,475$ a été obtenue pour la régression linéaire entre les deux marqueurs et une corrélation significative a été observée ($p < 0.0001$) avec l'analyse de corrélation Spearman (**Fig. 4.4**).

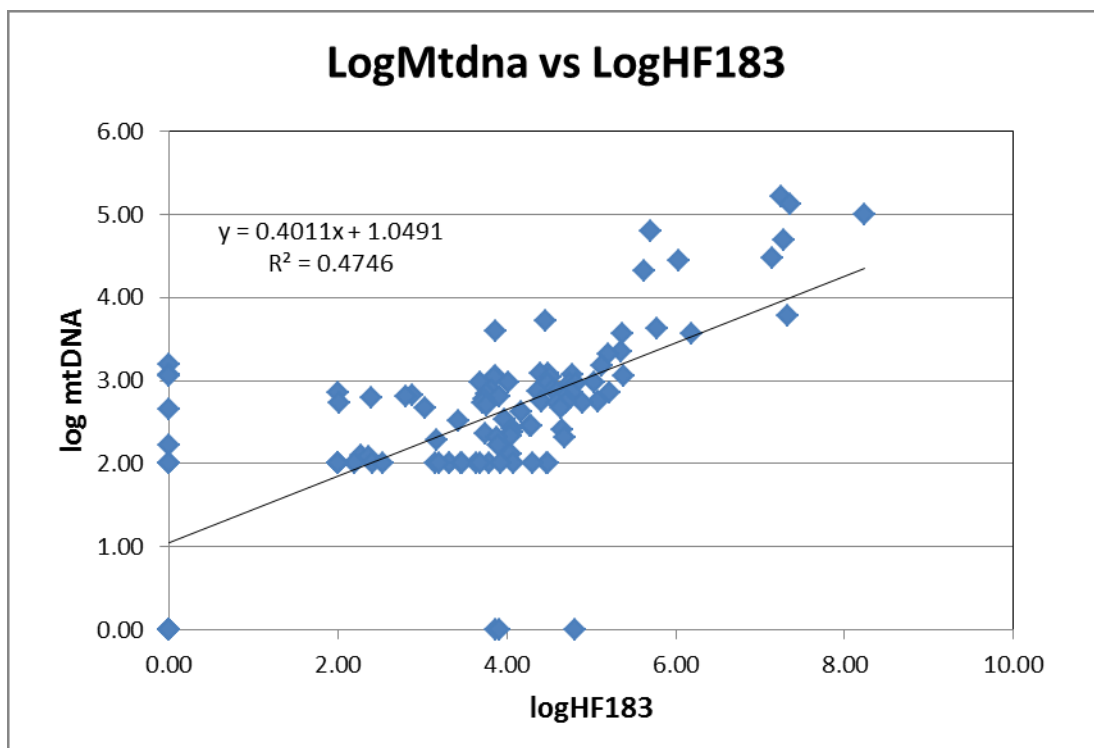


Figure 4.4 Régression linéaire entre le marqueur d'ADN mitochondrial humain et le marqueur *Bacteroides* HF183 ($R^2 = 0.4746$ et $p < 0.0001$).

4.2 Amorces pour l'ADN mitochondrial du raton laveur et sonde TaqMan pour la quantification de l'ADN mitochondrial humain

4.2.1 Test des amorces pour la détection de l'ADN mitochondrial du raton laveur

Nous avons développé des amorces spécifiques pour l'ADN mitochondrial du raton laveur, puisque ce dernier habite dans les milieux urbains et peut être la cause de contamination fécale. Ces amorces ont été utilisées pour les échantillons du canal 1. Sept des 27 échantillons du canal 1 ont été positifs pour le raton laveur suggérant une contamination fécale par cet animal (**Fig. 4.5**).

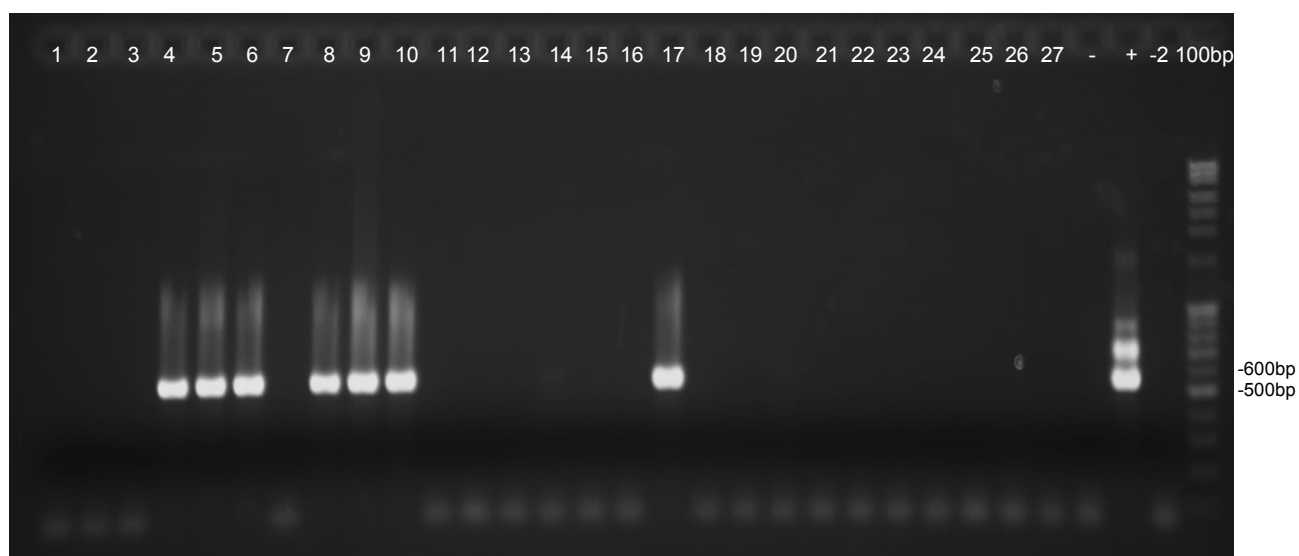


Figure 4.5 Exemple de résultats pour la détection de l'ADN mitochondrial du raton laveur avec les échantillons du canal 1.

Les échantillons (puits 1-27), les contrôles négatifs et positifs (puits 28-30) et le marqueur moléculaire midrange plus 100bp-5000bp (Fisher Scientific, Waltham, MA, É.-U.) (puits 31) ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%

4.2.2 Test de la sonde TaqMan pour la quantification de l'ADN mitochondrial

La quantification par qPCR s'est faite avec un protocole utilisant le SYBR green comme composante révélatrice de la fluorescence. Outre les coûts inhérents à ce produit, des problèmes de dimères d'amorces peuvent survenir. Pour pallier ces problèmes, un protocole utilisant une sonde de type TaqMan a été utilisée comme composante révélatrice de la fluorescence. La figure 4.6 illustre la comparaison des deux protocoles. La quantification de l'ADN mitochondrial par les deux protocoles a généré des résultats comparables.

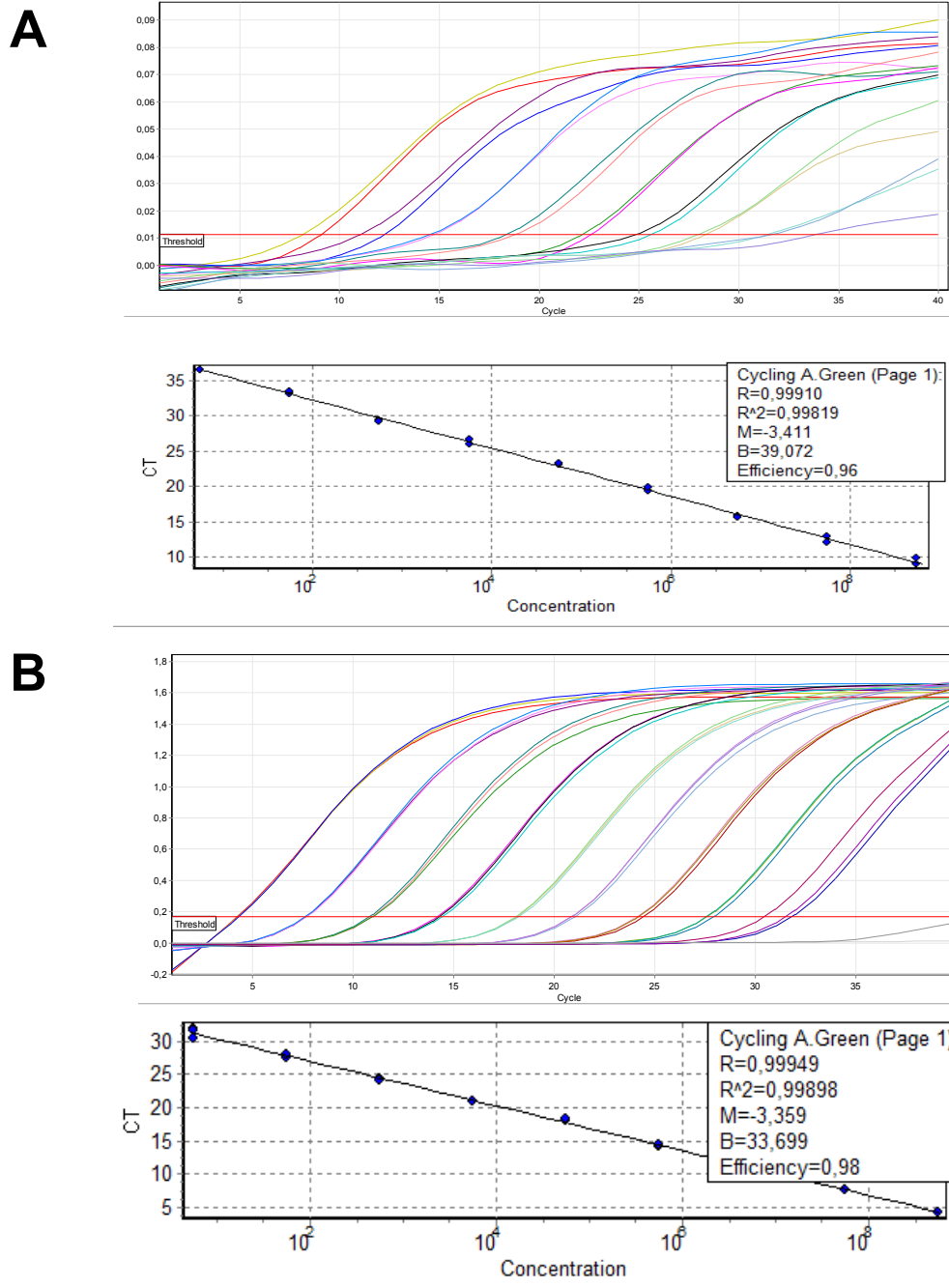


Figure 4.6 Comparaison de la quantification de l'ADN mitochondrial humain en utilisant une sonde TaqMan (A) et en utilisant le SYBR Green I (B) pour les mêmes amorces.

5 DISCUSSION

5.1 Analyse des échantillons

5.1.1.1 Analyse de l'origine de la contamination pour le ruisseau 1

Les résultats obtenus pour le ruisseau 1 démontrent une contamination fécale d'origine humaine à toutes les stations échantillonnées du ruisseau, à des niveaux particulièrement élevés. Les quantités d'*E. coli* moyennes détectées ($\sim 1700\text{--}4400$ *E. coli*/100 mL) (**Tableau 4.2**) étaient nettement supérieures à la limite établie par Santé Canada pour l'usage d'eau pour contacts secondaires (1000 *E. coli*/100 mL) (**Tableau 1.2**), ce qui pourrait rendre plus risqués les contacts avec l'eau du ruisseau. Les niveaux de marqueurs humains de contamination fécale étaient aussi élevés. La quantité d'ADN mitochondrial mesurée dans l'influent d'une station d'épuration d'eaux usées a été mesurée entre $2,7$ et $9,9 \times 10^4$ copies/100 mL (Kortbaoui *et al.*, 2009), alors que les valeurs retrouvées dans le ruisseau variaient entre $3,5 \times 10^2$ et $1,1 \times 10^3$. Pour le marqueur *Bacteroides* HF183, la quantité retrouvée dans l'influent d'une station d'épuration a été mesurée à environ $2,0 \times 10^8$, en comparaison avec les valeurs retrouvées dans le ruisseau qui varient entre $7,0 \times 10^3$ et $6,0 \times 10^4$ (**Tableau 4.2**) (Seurinck *et al.*, 2005).

À la lumière des résultats obtenus, il est clair que le ruisseau 1 est affecté par la contamination fécale d'origine humaine. Deux sources en particulier étaient susceptibles de contribuer à la contamination du ruisseau. Premièrement, deux exutoires d'égouts pluviaux se déversent dans le ruisseau à proximité des points B et C (**Fig. 3.1**). Les conduites pluviales peuvent aussi être affectées par un branchement inversé par les égouts sanitaires. La deuxième source possible était le réseau d'égouts pluviaux 1 qui est situé en amont de ruisseau 1 et qui se déverse dans celui-ci et pourrait aussi être affecté à différents points par les raccordements inversés (**Tableau 3.3**). Les résultats de l'analyse statistique ont démontré qu'il n'y avait pas de variations significatives aux points échantillonnés. Peu importe d'où provenait l'échantillon du ruisseau, les valeurs étaient comparables. Étant donné qu'il n'y avait pas de variation, les exutoires pluviaux à proximité des points B et C ne sont probablement pas des sources importantes de contamination fécale du ruisseau. La source probable de la contamination se trouve donc dans le réseau d'égouts pluviaux 1 situé en amont du ruisseau 1.

L'analyse de sédiments n'a donné aucun résultat quantifiable malgré des résultats positifs pour les PCR en niche. Une purification sur colonne de PVPP a été testée, mais n'a pas

permis d'obtenir de signal pour la qPCR. Étant donné que la PCR en niche est plus sensible que la qPCR, il est probable que la quantité d'ADN dans les échantillons de sédiments soit trop faible pour être quantifié, mais en quantité suffisante pour être détectée par les PCR en niche.

5.1.1.2 Origine de la contamination pour le réseau d'égouts pluviaux 1

Les résultats obtenus dans le réseau d'égouts pluviaux 1 sont en accord avec les résultats obtenus pour le ruisseau 1. Suite à une analyse statistique, il a été démontré que l'origine de la contamination du ruisseau 1 provenait probablement de l'amont du ruisseau. Les niveaux élevés de 3 marqueurs de contamination fécale retrouvés à plusieurs points échantillonnés dans le réseau d'égouts pluviaux 1 démontrent l'impact qu'a le réseau d'égouts pluviaux sur la qualité de l'eau du ruisseau 1 (**Tableau 4.4**). Les échantillons ont été prélevés au niveau des canalisations pluviales, ce qui implique une contamination par les égouts sanitaires. Les stations avec les niveaux des marqueurs les plus élevés représentent probablement les sites les plus critiques. Pour des raisons techniques, le réseau d'égouts pluviaux 1 a seulement été échantillonné pendant un jour et il est possible que les résultats aient été différents si l'échantillonnage avait été effectué sur une période plus longue ou si l'échantillonnage avait été effectué en période de précipitation. Par contre, l'échantillonnage est suffisant pour démontrer que le réseau contamine le ruisseau 1 situé en aval.

5.1.1.3 Origine de la contamination pour le réseau d'égouts pluviaux 2

Le réseau d'égouts pluviaux 2 a été échantillonné de façon aléatoire par un organisme municipal afin de déterminer si le réseau était affecté par les raccordements inversés. Ce réseau n'avait jamais été échantillonné auparavant. Les résultats de l'analyse des échantillons démontrent une contamination des canalisations pour plusieurs points à travers le réseau d'égouts pluviaux 2 ainsi que plusieurs points pour lesquels les marqueurs n'étaient pas détectés (**Tableau 4.5**). En comparaison avec les sites analysés, une plus grande discordance entre l'ADN mitochondrial et le marqueur *Bacteroides* HF183 a été observée, ce qui peut être en partie expliqué par les quantités plus faibles de contamination fécale. Les résultats ont permis à l'organisme municipal d'avoir de l'information sur la présence de la contamination fécale dans le réseau d'égouts pluviaux 2. L'information sera utile dans des études futures pour localiser plus précisément les conduites affectées par les raccordements inversés dans ce réseau d'égouts pluviaux.

5.1.1.4 Origine de la contamination pour le ruisseau 2

La problématique initiale du ruisseau 2 était très similaire au ruisseau 1. C'est un ruisseau qui reçoit de l'eau pluviale lors de précipitations, mais qui est possiblement contaminé par les conduites sanitaires qui se déversent dans les conduites pluviales, ce qui contamine le ruisseau. Les résultats de l'analyse de contamination fécale ont démontré une contamination fécale élevée pour les deux marqueurs à presque toutes les stations du ruisseau (**Tableau 4.6**). Les niveaux de marqueurs de contamination ne semblent pas être affectés par la proximité d'exutoire d'égouts pluviaux. Il est probable que le réseau d'égouts pluviaux situé en amont du ruisseau 2 soit à l'origine de la contamination. Par contre, il n'a pas été échantillonné au cours de cette étude. Le ruisseau a seulement été échantillonné une fois et donc les résultats pourraient être différents si l'échantillonnage avait été effectué sur une période plus longue. Dans le réseau d'égouts pluviaux en amont du ruisseau 2 se trouvent des égouts unitaires qui pourraient déborder en période de précipitations. Il serait intéressant d'étudier la contamination du réseau d'égouts pluviaux en amont du ruisseau en temps sec ainsi qu'en période de précipitations pour voir l'impact des trop-pleins d'égouts unitaires sur la qualité de l'eau du ruisseau. Des échantillonnages futurs permettront d'étudier le réseau d'égouts pluviaux situé en amont du ruisseau.

5.1.1.5 Origine de la contamination pour le canal 1

La problématique du canal 1 est particulière et très différente des autres sites échantillonnés pour cette étude. Ce canal qui alimente en eau potable deux stations d'épuration devrait en principe être protégé contre la contamination fécale. Malgré ce fait, plusieurs conduites sanitaires sont présentes en parallèle ou à proximité du canal et pourraient être des sources de contamination fécale. Un niveau faible d'*E. coli* a été détecté dans des études précédentes sur le canal, ce qui peut être attribué aux égouts sanitaires ainsi qu'à la faune sauvage à proximité du canal (Guérineau *et al.*, 2014). Le marqueur HF183 n'a pas été détecté dans les échantillons pour le canal et 38% des échantillons étaient positifs pour l'ADN mitochondrial (**Tableau 4.7**). Les niveaux d'ADN mitochondrial détectés étaient très faibles en comparaison avec les autres sites visés par cette étude. Étant donné les niveaux faibles et l'absence de marqueurs dans les échantillons, il est possible que les niveaux de contamination fécale humaine dans le canal soient très faibles et sous la limite de détection par PCR pour les marqueurs génétiques. Puisque le canal a un débit et un volume d'eau très élevée en

comparaison avec les autres sites, le facteur de dilution non négligeable rend difficile la détection de la contamination avec les marqueurs génétiques. En général, les résultats semblent démontrer une contamination faible à quelques endroits sur le canal. Une étude approfondie avec les marqueurs chimiques utilisés par le consortium de recherche pourrait permettre de déterminer plus précisément s'il existe une contamination fécale significative pour le canal.

Comme pour le ruisseau 1, les échantillons de sédiments n'ont donné aucun signal positif pour la PCR quantitative, ce qui est probablement causé par la présence d'inhibiteurs.

5.1.2 Corrélation entre le marqueur *Bacteroides* HF183 et l'ADN mitochondrial

L'objectif principal de ce projet de recherche a été de déterminer s'il existe une corrélation entre deux marqueurs génétiques de contamination fécale humaine, soit le marqueur *Bacteroides* HF183 et l'ADN mitochondrial. En comparaison avec l'ADN mitochondrial, le marqueur HF183 a fait l'objet d'une grande quantité d'études et a démontré son efficacité dans la détection de la contamination fécale humaine (Boehm *et al.*, 2013, Layton *et al.*, 2013). L'utilisation de l'ADN mitochondrial est une approche plus récente qui a fait l'objet d'une quantité limitée d'études scientifiques. Démontrer une corrélation entre le niveau de l'ADN mitochondrial et du marqueur HF183 dans des échantillons contaminés permettrait de démontrer l'utilité de l'ADN mitochondrial dans la détection de la contamination fécale d'origine humaine. Dans des études précédentes effectuées au laboratoire du professeur Villemur, établir une corrélation a été difficile. Les niveaux de contamination des échantillons détectés étaient très faibles et les niveaux détectés étaient souvent à limite de la quantification ou étaient trop faibles pour être quantifiés (résultats non publiés). Pour cette étude, les échantillons provenaient de ruisseaux et de canalisations ayant un niveau de contamination fécale particulièrement élevée par rapport aux études précédentes (**Tableau 4.3, Tableau 4.4, Tableau 4.5 et Tableau 4.6**). Ceci a permis d'avoir un grand ensemble de données pour établir une corrélation. Au total, 114 échantillons identifiés comme étant positifs ont été inclus dans l'étude de corrélation. À partir des valeurs log des résultats de la qPCR, une étude de régression linéaire et de corrélation a été effectuée entre les deux marqueurs (**Fig. 4.4**). Une corrélation positive et significative ($R^2 = 0.48$, $p < 0.0001$) entre les deux marqueurs a été observée.

La valeur de R^2 obtenue dans cette étude est comparable à celle observée dans d'autres études de corrélation entre différents marqueurs de contamination fécale (Kapoor *et al.*, 2013,

Sauvé *et al.*, 2012). Dans les travaux de Sauvé *et al.* (2012), une valeur R^2 de 0.56 est obtenue pour la corrélation entre la caféine (marqueur chimique) et les coliformes fécaux. Dans l'étude de Kapoor *et al.* (2013), une corrélation significative est établie entre l'ADN mitochondrial humain et une souche de *Bacteroides* spécifique à l'humain en utilisant des amorces différentes de celles utilisées dans ce projet de recherche. La valeur de R^2 établie dans l'étude de Kapoor ($R^2 = 0.38$) est similaire à la valeur obtenue dans la présente étude ($R^2 = 0.48$). Ce projet de recherche est donc le deuxième à établir une corrélation significative entre l'ADN mitochondrial humain et une souche de *Bacteroides* spécifique à l'humain, et ce, malgré l'utilisation d'amorces différentes.

La corrélation positive démontrée dans la présente étude permet de conclure que l'ADN mitochondrial peut être utilisé dans la détection de la contamination fécale humaine et donne des résultats similaires au marqueur HF183. L'utilisation des deux marqueurs pour la détection de la contamination humaine telle qu'elle est effectuée dans cette étude serait une approche à envisager pour des études futures afin d'avoir des résultats plus précis.

5.1.3 Comparaison des méthodes de détection de la contamination fécale en milieu urbain.

Ce projet est l'un des nombreux projets de détection de contamination fécale en milieu urbain qui ont été entrepris dans les 10 dernières années en utilisant plusieurs marqueurs ou indicateurs de contamination fécale. Avant le développement du source tracking, la plupart des analyses de contamination fécale en milieu urbain utilisaient *E. coli* comme marqueur de contamination fécale. Comme il a été démontré dans la revue de la littérature, *E. coli* est un marqueur non spécifique à un organisme hôte. La détection de la contamination fécale d'origine humaine en utilisant *E. coli* risque donc d'être affectée par les sources de contamination fécale non humaines telles que celle des rats, des mouffettes et des oiseaux. Comme il a été démontré dans l'étude de Kapoor *et al.* (2013), la quantité d'*E. coli* varie indépendamment de la quantité d'ADN mitochondrial humain et d'un marqueur de *Bacteroides* spécifique à l'humain. Dans l'étude présentée dans ce mémoire, l'utilisation de marqueurs spécifiques a permis de faire la quantification de la contamination fécale humaine en évitant la problématique de la contamination non humaine en milieu urbain. Étant donné que les sites échantillonnés dans cette étude étaient tous situés dans des milieux avec population dense, les niveaux des marqueurs humains étaient particulièrement élevés (à l'exception du canal 1), ce qui était prévu.

Comme pour l'étude de Kapoor *et al.* (2013), la quantité du marqueur *Bacteroides* est plus élevée que la quantité d'ADN mitochondrial pour les échantillons positifs pour les deux marqueurs. Il est possible que la demi-vie de l'ADN bactérien soit plus longue dans l'environnement que l'ADN mitochondrial. Par contre, la quantité de *Bacteroides* avait été mesurée comme étant beaucoup élevée par rapport à l'ADN mitochondrial dans des échantillons d'influent d'une station d'épuration d'eau (Schill *et al.*, 2008). Il est donc probable que la quantité d'ADN de *Bacteroides* soit beaucoup plus élevée que la quantité d'ADN mitochondrial dans les fèces humaines ce qui influence le niveau des marqueurs retrouvés dans l'environnement.

5.2 Conception d'amorce et de sonde TaqMan

5.2.1 Amorces ciblant l'ADN mitochondrial du raton laveur (*Procyon lotor*)

Suite à une réunion avec le consortium de recherche, il a été mis en l'évidence que les ratons laveurs ont été aperçus à plusieurs reprises près des sites échantillonnés au cours de ce projet (données non publiées). Il est reconnu que les ratons laveurs peuvent trouver refuge ou former des nids dans les infrastructures d'égouts des villes contribuant ainsi au problème de contamination fécale. Étant donné leurs fortes populations dans les zones urbaines, il a été décidé de développer des outils de détection de contamination fécale ciblant le raton laveur et ainsi pouvoir estimer leur impact dans le problème de contamination fécale. À la date de la publication de ce mémoire, un seul article a été publié sur l'identification de la contamination fécale du raton laveur (Ram *et al.*, 2007). Les recherches des auteurs ont porté sur l'identification de la contamination en utilisant des séquences du gène Beta-glucuronidase chez *E. coli* qui serait suffisamment différent chez les espèces hôtes permettant l'identification de la source de contamination. Cette approche utilise une librairie d'espèces bactériennes, ce qui est une approche critiquée dans la littérature scientifique (Gordon, 2001).

Les amorces développées ont permis de faire la détection de l'ADN mitochondrial du raton laveur. Les amorces ont été testées avec les échantillons du canal 1 et du ruisseau 2 (2012-2013) (**Fig 5.5**). De l'ADN de raton laveur a été détecté à plusieurs reprises pour ces deux sites, ce qui peut être attribué à de la contamination fécale du raton laveur. Les amorces pourront être utiles lors d'analyses futures surtout dans les cours d'eau urbains où il peut y avoir des niveaux élevés d'*E. coli* sans sources de contamination d'origine humaine. Une prochaine

étape de validation serait de tester les amorces avec des fèces de raton laveur plutôt qu'avec de l'ADN pur.

5.2.2 Sonde TaqMan pour la quantification de l'ADN mitochondrial humain

Présentement, les approches de PCR quantitative utilisées au laboratoire du professeur Richard Villemur sont basées sur la détection des amplicons par le SYBR green I, une molécule fluorescente qui s'intercale entre les molécules d'ADN double brin. Le SYBR green qui est rajouté au mélange réactionnel de PCR est très peu fluorescent lorsqu'il est en solution libre, mais très fluorescent lorsqu'il s'intercale dans l'ADN double brin. Pendant l'étape de l'extension, les molécules de SYBR green I vont s'intercaler dans la molécule d'ADN double brin qui est synthétisée et le signal fluorescent est détecté par l'appareil de PCR quantitatif. L'amplification de copie d'ADN va donc être proportionnelle à l'augmentation du signal de fluorescence qui est ensuite détecté par l'appareil. L'utilisation du SYBR Green I comporte certains avantages et inconvénients. Premièrement, cette molécule s'intercale sans spécificité à toutes molécules d'ADN double brin présentes dans le mélange réactionnel de PCR, ce qui peut inclure des dimères d'amorces, des amplifications non spécifiques ou toute interaction ADN-ADN autre que l'amplicon désiré. Ceci peut fausser les résultats de la quantification et amener un bruit de fond significatif. Il est donc très important de concevoir des amorces qui amplifient une région spécifique et sans dimères avec le SYBR Green I. Un test de dénaturation doit être effectué à la fin de chaque programme de PCR pour vérifier la spécificité de l'amplicon. La non-spécificité du SYBR green peut être un avantage puisqu'on n'a pas besoin de concevoir une nouvelle sonde pour chaque essai PCR comme dans le cas des sondes hydrolysantes doublement marquées dont il sera question ci-après.

L'approche de PCR quantitative basée sur les sondes hydrolysantes doublement marquées connue commercialement sous le nom «TaqMan» fonctionne selon un principe différent. Une sonde d'oligonucléotide est synthétisée avec une molécule fluorescente en 5' et une molécule masquante (quencher) en 3'. Étant donné leur proximité dans la sonde, le signal fluorescent est supprimé par la molécule masquante. Pendant l'étape de l'hybridation, la sonde va s'hybrider avec le brin complémentaire à sa séquence et va être clivée par l'activité 5' – 3' exonucléase de la Taq polymérase lors de la synthèse du nouveau brin. Le clivage de la sonde va libérer la molécule fluorescente dans la solution et permettre la détection du signal. L'augmentation de l'intensité du signal va être proportionnelle à l'amplification de la région cible.

Il y a plusieurs avantages avec l'utilisation de cette méthode. Premièrement, les sondes hydrolysantes sont spécifiques à la région complémentaire, ce qui permet d'éviter d'obtenir une quantification erronée par une amplification non spécifique ou des dimères d'amorces. Un deuxième avantage de cette méthode est que les coûts associés aux sondes hydrolysantes sont beaucoup moins élevés que ceux du SYBR Green I.

La sonde TaqMan développée dans cette étude pour la quantification de l'ADN mitochondrial humain a été mise à l'essai avec de l'ADN pur. La quantification a donné des résultats comparables avec la quantification en utilisant du SYBR green I (**Fig. 4.6**). Étant donné que les résultats obtenus sont comparables, la sonde TaqMan peut être utilisée comme alternative moins coûteuse par rapport à la quantification en utilisant le SYBR green, surtout lors d'une étude qui requiert une grande quantité de qPCR.

6 CONCLUSION

La contamination fécale des eaux demeure un problème ayant des répercussions sérieuses sur la santé humaine. Plusieurs approches ont été développées pour détecter la contamination fécale. Le « microbial source tracking » est une jeune discipline scientifique qui peut permettre de trouver l'origine de la contamination fécale, une information clé pour la remédiation de la contamination. À travers ce projet de recherche, il a été démontré que l'ADN mitochondrial était un excellent marqueur de contamination fécale grâce à une analyse de corrélation entre deux marqueurs de contamination fécale humaine. Ensuite, une analyse statistique effectuée à partir d'une étude de terrain a démontré que l'origine de la contamination fécale d'un ruisseau urbain recevant des eaux pluviales provenait en amont du ruisseau. Une analyse de la contamination fécale du réseau d'égouts pluviaux situé en amont du ruisseau étudié a confirmé les résultats de l'analyse du ruisseau et a permis de voir l'impact sur la qualité de l'eau du ruisseau en aval. Les analyses d'un deuxième réseau d'égouts pluviaux ainsi que d'un deuxième ruisseau urbain ont permis de détecter la contamination fécale humaine aux différents points échantillonnés, ce qui sera utile dans des études futures de ces sites. En général, il est clair que les sites échantillonnés étaient affectés par les égouts sanitaires qui peuvent être branchés aux conduites des égouts pluviaux. L'analyse d'une source d'eau potable (canal 1) démontre que ce site pourrait être faiblement contaminé et nécessiterait plus d'analyses pour estimer l'ampleur du problème. Une sonde TaqMan pour la quantification de l'ADN mitochondrial humain a été développée avec succès ainsi que des amorces pour la détection de l'ADN mitochondrial du raton laveur. Ces outils seront utiles pour la réalisation d'études futures sur la contamination fécale.

7 RÉFÉRENCES

- Andersson SG & Kurland CG (1999) Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Current opinion in microbiology* 2(5):535-541.
- Ashbolt NJ (2004) Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* 198(1-3):229-238.
- Bernhard AE & Field KG (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.
- Boehm AB, Van De Werfhorst LC, Griffith JF, Holden PA, Jay JA, Shanks OC, Wang D & Weisberg SB (2013) Performance of forty-one microbial source tracking methods: a twenty-seven lab evaluation study. *Water Res* 47(18):6812-6828.
- Bullen TF, Forrest S, Campbell F, Dodson AR, Hershman MJ, Pritchard DM, Turner JR, Montrose MH & Watson AJ (2006) Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 86(10):1052-1063.
- Caldwell JM & Levine JF (2009) Domestic wastewater influent profiling using mitochondrial real-time PCR for source tracking animal contamination. *Journal of microbiological methods* 77(1):17-22.
- Caldwell JM, Payment P & Villemur R (2011) Mitochondrial DNA as Source Tracking Markers of Fecal Contamination (chapitre 10). *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies*, Hagedorn C, Blanch AR & Harwood VJ (Édit.) Springer New York, 10.1007/978-1-4419-9386-1.
- Caldwell JM, Raley ME & Levine JF (2007) Mitochondrial multiplex real-time PCR as a source tracking method in fecal-contaminated effluents. *Environmental science & technology* 41(9):3277-3283.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE & Relman DA (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308(5728):1635-1638.
- Fawell J & Nieuwenhuijsen MJ (2003) Contaminants in drinking water. *British medical bulletin* 68(1):199-208.
- Ferguson D & Signoretto C (2011) Environmental Persistence and Naturalization of Fecal Indicator Organisms (chapitre 17). *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies*, Hagedorn C, Blanch AR & Harwood VJ (Édit.) Springer New York, 10.1007/978-1-4419-9386-1.
- Field KG & Samadpour M (2007) Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res* 41(16):3517-3538.
- Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA & Olsen GJ (2008) Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology* 74(8):2461-2470.
- Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F & Welling GW (1998) Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with

- group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and environmental microbiology* 64(9):3336-3345.
- Gordon DM (2001) Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. *Microbiology (Reading, England)* 147(Pt 5):1079-1085.
- Guérineau H, Dorner S, Carrière A, McQuaid N, Sauvé S, Aboufadi K, Hajj-Mohamad M & Prévost M (2014) Source tracking of leaky sewers: A novel approach combining fecal indicators in water and sediments. *Water Research* 58(0):50-61.
- Hartley CL, Clements HM & Linton KB (1978) Effects of cephalixin, erythromycin and clindamycin on the aerobic gram-negative faecal flora in man (Plate VII). *Journal of Medical Microbiology* 11(2):125-135.
- Hrudey SE, Payment P, Huck PM, Gillham RW & Hrudey EJ (2003) A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 47(3):7-14.
- Ishii S, Ksoll WB, Hicks RE & Sadowsky MJ (2006) Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds. *Applied and environmental microbiology* 72(1):612-621.
- Kapoor V, Smith C, Santo Domingo JW, Lu T & Wendell D (2013) Correlative Assessment of Fecal Indicators using Human Mitochondrial DNA as a Direct Marker. *Environmental science & technology* 47(18):10485-10493.
- Kinzelman JL, Singh A, Ng C, Pond KR, Bagley RC & Gradus S (2005) Use of IDEXX Colilert-18® and Quanti-Tray/2000 as a Rapid and Simple Enumeration Method for the Implementation of Recreational Water Monitoring and Notification Programs. *Lake and Reservoir Management* 21(1):73-77.
- Kortbaoui R, Locas A, Imbeau M, Payment P & Villemur R (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 Res* 43(7):2002-2010.
- Lavoie A (2006) Guide méthodologique pour la recherche et l'élimination des raccordements inversés dans les réseaux de collecte d'eaux usées municipales. Édit Affaires MD & Régions MEDQuebec).
- Layton BA, Cao Y, Ebentier DL, Hanley K, Balleste E, Brandao J, Byappanahalli M, Converse R, Farnleitner AH, Gentry-Shields J, Gidley ML, Gourmelon M, Lee CS, Lee J, Lozach S, Madi T, Meijer WG, Noble R, Peed L, Reischer GH, Rodrigues R, Rose JB, Schriewer A, Sinigalliano C, Srinivasan S, Stewart J, Van De Werfhorst LC, Wang D, Whitman R, Wuertz S, Jay J, Holden PA, Boehm AB, Shanks O & Griffith JF (2013) Performance of human fecal anaerobe-associated PCR-based assays in a multi-laboratory method evaluation study. *Water Res* 47(18):6897-6908.
- Lévesque B & Gauvin D (2007) Microbiological guideline values for recreational bathing in Canada: Time for change? *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie médicale / AMMI Canada* 18(2):153-157.
- Madoux-Humery AS, Dorner S, Sauve S, Aboufadi K, Galarneau M, Servais P & Prevost M (2013) Temporal variability of combined sewer overflow contaminants: evaluation of

- wastewater micropollutants as tracers of fecal contamination. *Water Res* 47(13):4370-4382.
- Mara DD & Oragui JI (1981) Occurrence of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in feces, sewage, and freshwater. *Applied and environmental microbiology* 42(6):1037-1042.
- Martellini A, Payment P & Villemur R (2005) Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Res* 39(4):541-548.
- NPDES (2012) *National Pollutant Discharge Elimination System.*, http://cfpub.epa.gov/npdes/home.cfm?program_id=5
- O'Connor DR (2002) Report of the Walkerton Inquiry :. Ontario Government Toronto).
- Payment P & Pintar K (2006) Waterborne Pathogens: A Critical Assessment of Methods, Results and Data Analysis. *Revue des sciences de l'eau* 19(3):233.
- Ram JL, Thompson B, Turner C, Nechvatal JM, Sheehan H & Bobrin J (2007) Identification of pets and raccoons as sources of bacterial contamination of urban storm sewers using a sequence-based bacterial source tracking method. *Water Res* 41(16):3605-3614.
- Santé Canada (2012) *Recommandations au sujet de la qualité des eaux utilisées à des fins récréatives au Canada.*, http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/guide_water-2012-guide_eau/index-fra.php (Consulté le 06 juin)
- Sauvé S, Aboulfadl K, Dorner S, Payment P, Deschamps G & Prevost M (2012) Fecal coliforms, caffeine and carbamazepine in stormwater collection systems in a large urban area. *Chemosphere* 86(2):118-123.
- Schill WB & Mathes MV (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.
- Sears CL (2005) A dynamic partnership: celebrating our gut flora. *Anaerobe* 11(5):247-251.
- Seiler RL, Zaugg SD, Thomas JM & Howcroft DL (1999) Caffeine and pharmaceuticals as indicators of waste water contamination in wells. *Ground Water* 37(3):405-410.
- Seurinck S, Defoirdt T, Verstraete W & Siciliano SD (2005) Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environmental microbiology* 7(2):249-259.
- Shanks OC, Kelty CA, Sivaganesan M, Varma M & Haugland RA (2009) Quantitative PCR for genetic markers of human fecal pollution. *Applied and environmental microbiology* 75(17):5507-5513.
- Soller JA, Schoen ME, Bartrand T, Ravenscroft JE & Ashbolt NJ (2010) Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of faecal contamination. *Water Res* 44(16):4674-4691.
- Vuong NM, Villemur R, Payment P, Brousseau R, Topp E & Masson L (2013) Fecal source tracking in water using a mitochondrial DNA microarray. *Water Res* 47(1):16-30.
- Wade TJ, Calderon RL, Brenner KP, Sams E, Beach M, Haugland R, Wymer L & Dufour AP (2008) High sensitivity of children to swimming-associated gastrointestinal illness: results using a rapid assay of recreational water quality. *Epidemiology* 19(3):375-383.

Walk ST, Alm EW, Gordon DM, Ram JL, Toranzos GA, Tiedje JM & Whittam TS (2009) Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Applied and environmental microbiology* 75(20):6534-6544.