

# Revue des méthodes de détermination de sources de contamination fécale de l'eau



**Marc-André Blais**, B.Sc., IRDA  
**Caroline Côté**, agr., Ph.D., IRDA  
**Richard Villemur**, Ph.D., INRS  
**Mylène Généreux**, M.Sc., IRDA  
**Philippe Cantin**, Ph.D., MDDELCC  
**Manuela Villion**, Ph.D., MDDELCC

**irda** Institut de recherche  
et de développement  
en agroenvironnement

**INRS**  
Université d'avant-garde

**Développement durable,  
Environnement et Lutte  
contre les changements  
climatiques**

**Québec** 

L'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA) est une corporation de recherche à but non lucratif, constituée en mars 1998 par quatre membres fondateurs, soit le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ), l'Union des producteurs agricoles (UPA), le ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MDDELCC) et le ministère de l'Économie, de l'Innovation et des Exportations (MEIE)



### **Notre mission**

L'IRDA a pour mission de réaliser des activités de recherche, de développement et de transfert en agroenvironnement visant à favoriser l'innovation en agriculture, dans une perspective de développement durable.

Chaque année, l'IRDA travaille sur une centaine de projets de recherche en collaboration avec de nombreux partenaires du milieu agricole et du domaine de la recherche

### **Pour en savoir plus**

[www.irda.qc.ca](http://www.irda.qc.ca)

### **Le document peut être cité comme suit :**

Blais, M.-A., Côté, C., Villemur, R., Généreux, M., Cantin, P., Villion, M. 2015. Revue des méthodes de détermination de sources de contamination fécale de l'eau. Rapport présenté au ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques. 40 pages.

## Table des matières

<b>1. Introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1 Problème et impact de la contamination microbiologique d'origine fécale .....	1
1.2 Détection de la contamination microbienne d'origine fécale .....	3
<b>2. Détermination des sources de contamination fécale de l'eau</b> .....	<b>6</b>
2.1 Méthodes dépendantes de la culture et d'une banque de matériel microbien de référence .....	6
2.1.1 Caractérisation phénotypique .....	7
2.1.2 Caractérisation génotypique .....	8
2.1.3 Avantages et désavantages des méthodes dépendantes de la culture et d'une banque de matériel microbien de référence .....	9
2.2 Méthodes indépendantes de la culture et d'une banque de matériel microbien de référence (méthodes moléculaires) .....	14
2.2.1 Avantages et désavantages des méthodes indépendantes de la culture et d'une banque de matériel microbien de référence .....	17
2.3 Méthodes dépendantes de la culture et indépendantes d'une banque de matériel microbien de référence .....	20
2.3.1 Avantages et désavantages des méthodes dépendantes de la culture et indépendantes d'une banque de matériel microbien de référence .....	20
2.4 Méthodes indépendantes de la culture et dépendantes d'une banque de matériel microbien de référence .....	20
2.4.1 Avantages et désavantages des méthodes indépendantes de la culture et dépendantes d'une banque de matériel microbien de référence .....	21
2.5 Marqueurs chimiques .....	21
2.5.1 Avantages et désavantages des marqueurs chimiques .....	21
<b>3. Études de cas au Canada</b> .....	<b>22</b>
3.1 Étude de cas no 1: <i>Development and validation of a microbial source tracking marker for the detection of fecal pollution by muskrats</i> .....	22
3.2 Étude de cas no 2: <i>Quantitative real-time PCR assays for sensitive detection of Canada goose-specific fecal pollution in water sources</i> .....	24
3.3 Étude de cas no 3: <i>An environmental survey of surface waters using mitochondrial DNA from human, bovine and porcine origin as fecal source tracking markers</i> .....	25
3.4 Étude de cas no 4: <i>Experience with the antibiotic resistance analysis and DNA fingerprinting in tracking faecal pollution at two lake beaches</i> .....	26
<b>4. Conclusions</b> .....	<b>27</b>
<b>5. Références</b> .....	<b>29</b>

## 1. Introduction

### 1.1 Problème et impact de la contamination microbiologique d'origine fécale

La contamination microbiologique d'origine fécale de l'eau est un problème qui a un impact majeur sur la qualité de l'eau à travers le monde. Les micro-organismes pathogènes pour l'homme tels que les virus, les bactéries ainsi que les protistes peuvent être présents dans la matière fécale. La consommation d'eau contaminée par les fèces présente donc un risque sérieux pour la santé humaine. Les contacts secondaires avec l'eau comme la baignade et la pêche peuvent aussi être dangereux. La contamination fécale peut présenter un risque alimentaire lorsque les produits de l'aquaculture ou de la pêche sont exposés à une contamination fécale ou lorsque l'eau contaminée est utilisée pour l'irrigation de fruits et légumes (Solomon *et al.*, 2002). La contamination fécale a souvent un impact économique important pour les régions qui dépendent fortement des activités touristiques aquatiques (MDDELCC, 2014a). La plupart des maladies causées par les micro-organismes pathogènes sont de nature gastro-intestinale et les symptômes peuvent varier d'un simple inconfort abdominal jusqu'aux diarrhées sérieuses qui peuvent être mortelles. Les micro-organismes pathogènes peuvent aussi causer des infections au niveau de la peau, des oreilles, des poumons, du foie ainsi que des autres organes du corps. *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* (*E. coli*) 0157:H7, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* ainsi que les virus des hépatites A et B font partie des micro-organismes pathogènes fréquemment retrouvés dans l'eau contaminée (Payment et Pintar, 2006, Wade *et al.*, 2008).

Les épidémies d'origine hydrique constituent un problème majeur dans les pays en développement, ce qui peut être en partie expliqué par le manque d'infrastructures pour la production d'eau potable ainsi que par le manque d'infrastructures pour l'évacuation et le traitement des eaux usées sanitaires. Dans les pays développés, la majorité de la population a généralement accès à une eau traitée, libre de contamination grâce aux usines de production d'eau potable. De plus, les égouts permettent d'acheminer les eaux sanitaires aux usines de traitement des eaux usées, ce qui limite la quantité de matière fécale rejetée dans l'eau (Ashbolt, 2004). Malgré les législations, les réglementations, ainsi que les infrastructures mises en place pour la protection de l'eau potable, la contamination fécale demeure un risque non négligeable dans les pays développés (Ashbolt, 2004). En 2000, 2300 personnes sont subitement

tombées malades et sept sont décédées suite à la consommation de l'eau du robinet contaminée dans la municipalité de Walkerton en Ontario. À la suite d'une enquête publique, il a été déterminé que l'origine de la contamination provenait du fumier épandu sur des terres agricoles situées à proximité de l'usine de purification de l'eau. Après un épisode de pluies torrentielles, le ruissellement du fumier avait contaminé l'un des puits de l'usine de purification de l'eau (Hrudey *et al.*, 2003). En 1993, environ 400 000 personnes sont tombées malades lorsque l'eau de la municipalité de Milwaukee dans l'état du Wisconsin a été contaminée par *Cryptosporidium parvum*. À cause de la résistance au chlore des ookystes de *Cryptosporidium parvum*, l'usine de purification affectée n'a pas été en mesure d'éviter cette épidémie hydrique (Mac Kenzie *et al.*, 1994). Il est donc clair que la contamination microbiologique d'origine fécale reste un facteur de risque très important pour la santé humaine et ce, même dans les pays développés. En plus de la contamination de l'eau provenant de réseaux publics, il est aussi possible que les puits privés qui alimentent l'eau du robinet dans les zones rurales soient affectés par la contamination fécale (MDDELCC, 2014b). Étant donné les risques que pose la contamination fécale, la protection des sources d'eau potable est un enjeu très important pour la santé publique (MDDELCC, 2014c).

Au Québec, la contamination fécale peut être d'origine humaine ou animale. Il existe trois grandes sources de contamination fécale humaine. Dans le premier cas, il s'agit d'une contamination qui provient des égouts. Les égouts unitaires ainsi que les égouts sanitaires dans un système séparatif peuvent être des sources de contamination. Les égouts unitaires sont des égouts qui reçoivent à la fois de l'eau de pluie ainsi que de l'eau sanitaire. En période de fortes précipitations, le trop-plein de ces égouts est relâché dans les cours d'eau sans être traité, ce qui peut entraîner une contamination fécale (NPDES, 2012). Dans le système d'égouts séparatifs, un égout traite l'eau de pluie et un égout traite l'eau sanitaire. Il arrive parfois qu'une conduite sanitaire soit branchée accidentellement à l'égout pluvial (généralement l'eau de pluie n'est pas traitée), ce qu'on nomme «raccordement inversé». En raison de la désuétude des égouts ou de l'introduction de racines dans les conduites, il est aussi possible qu'un égout sanitaire se déverse en partie dans un égout pluvial, ce qui entraîne une contamination fécale (Lavoie, 2006, McFadden, 2006). La deuxième source de contamination humaine provient des fosses septiques que possèdent environ un million de Québécois. Elles peuvent être à l'origine de la contamination lorsqu'elles sont défectueuses ou mal entretenues (MDDEFP, 2013). Une

troisième source de contamination humaine provient des usines de traitement des eaux usées. L'efficacité de ces usines à réduire la quantité de micro-organismes pathogènes relâchés dans l'eau traitée peut varier grandement selon le type de traitement effectué. Certaines usines ne font qu'un traitement primaire de l'eau usée sans faire la désinfection de l'eau, ce qui n'élimine pas les micro-organismes pathogènes (Frigon *et al.*, 2013).

La contamination fécale d'origine animale peut provenir de l'épandage de fumiers en milieu agricole (MDDELCC, 2014a). Lors de précipitations, le ruissellement de surface ou le transport des micro-organismes vers les drains peuvent contaminer les eaux avoisinantes. La faune urbaine (ratons laveurs, moufettes, etc.), les animaux domestiques, ainsi que les animaux sauvages sont aussi une source potentielle de contamination d'origine animale au Québec.

La contamination fécale animale et humaine peut être diffuse ou ponctuelle. La contamination diffuse est définie comme ayant plusieurs sources difficilement localisables géographiquement et d'intensité variable. En milieu agricole, la contamination fécale diffuse pourrait survenir suite au ruissellement de surface ou au lessivage. À l'opposé de la contamination diffuse, la contamination ponctuelle a une origine fixe et facilement localisable (Hundesda *et al.*, 2009). La contamination par une usine de traitement des eaux usées, via un ouvrage de surverse par exemple, serait un exemple de contamination ponctuelle. La plupart des municipalités au Québec ont à la fois des zones agricoles ainsi que des zones urbaines, ce qui peut entraîner une contamination fécale diffuse dont l'origine peut être difficile à identifier.

## **1.2 Détection de la contamination microbienne d'origine fécale**

Plusieurs stratégies ont été développées pour faire le suivi de la contamination fécale dans l'eau. Malgré le fait que le danger principal de la contamination fécale soit dû aux micro-organismes pathogènes, le suivi effectué par la détection directe des micro-organismes pathogènes est une approche problématique pour plusieurs raisons. Puisqu'il existe une très grande variété de micro-organismes pathogènes, il faudrait élaborer une méthode de détection pour chaque micro-organisme pathogène afin de détecter la contamination fécale, ce qui serait très coûteux. De plus, les micro-organismes pathogènes ne sont pas tous représentés uniformément dans les populations hôtes humaines et animales. Leur présence dans l'eau est plutôt sporadique et donc très difficile à suivre (Payment et Pintar, 2006). Les analyses de micro-organismes pathogènes

requièrent un très grand volume d'eau, ce qui est laborieux pour les analyses routinières. Malheureusement, la concentration de larges quantités d'eau a souvent tendance à également concentrer les molécules inhibitrices, ce qui peut poser problème lors des analyses subséquentes (Straub et Chandler, 2003).

Pour faire un suivi efficace et moins coûteux de la contamination fécale, on utilise la détection de bactéries indicatrices de contamination fécale. Celles-ci sont des bactéries qui vivent en relation commensale dans l'intestin des humains et des animaux et qui sont relâchées de façon constante dans les fèces. Leur concentration dans les matières fécales est beaucoup plus élevée que les micro-organismes pathogènes, ce qui rend leur détection plus facile dans les cours d'eau (Cabral, 2010). Au Canada, la bactérie indicatrice de contamination fécale la plus utilisée en eau douce est *E. coli*. Cette bactérie à Gram négatif se retrouve dans l'intestin de la plupart des animaux endothermes. Puisque cette bactérie ne se retrouve pas naturellement dans les cours d'eau, la présence de cette bactérie est indicatrice d'une contamination fécale (Edberg *et al.*, 2000). La détection d'*E. coli* peut être effectuée à partir d'un échantillon d'eau selon le test des coliformes thermotolérants, soit un dénombrement de colonies croissant sur un milieu et des conditions sélectifs. *E. coli* peut aussi être quantifiée de façon plus précise en utilisant un test de croissance avec un substrat qui est clivé par une enzyme spécifique à *E. coli* (Kinzelman *et al.*, 2005). L'usage d'*E. coli* comme bactérie indicatrice de contamination fécale a permis de développer certaines normes et réglementations quant à l'utilisation des eaux pour la consommation ainsi que pour des fins récréatives (Santé Canada, 2012). Les entérocoques (anciennement les streptocoques fécaux) sont un autre groupe de bactéries indicatrices de contamination fécale. Ils sont généralement détectés par un test de croissance sélectif. Étant donnée leur résistance au sel, ils sont généralement considérés comme de meilleurs indicateurs pour la détection de la contamination fécale en milieux marins.

L'utilisation de bactéries indicatrices pour la détection de la contamination fécale comporte certains désavantages. En effet, l'utilisation seule de ces bactéries ne permet pas de trouver l'origine (animale ou humaine) de la contamination, puisque les bactéries comme *E. coli* sont présentes dans les fèces de tous les animaux endothermes. L'origine de la contamination fécale est une information nécessaire pour faire un suivi efficace de la contamination. Les stratégies, approches et solutions envisageables pour remédier au problème de la contamination fécale et

améliorer la qualité de l'eau s'avèrent très différentes en fonction de l'origine de la contamination (Field et Samadpour, 2007). Puisque certains micro-organismes pathogènes ont une spécificité pour leur organisme hôte, la contamination fécale humaine représente le plus gros risque pour la santé humaine (Soller *et al.*, 2010). D'un point de vue de santé publique, la détection de la contamination fécale humaine est donc prioritaire par rapport à la contamination qui provient des autres animaux.

Pour déterminer l'origine de la contamination fécale, une première approche, développée dans les années 1970, utilise le ratio des coliformes thermotolérants et des entérocoques. Cette approche est basée selon le fait que le niveau d'entérocoques est généralement plus élevé chez les animaux et le niveau de coliformes thermotolérants est généralement plus élevé chez les humains. Un ratio a été déterminé pour la contamination humaine et animale, ce qui permet de déterminer l'origine de la contamination à partir d'un échantillon d'eau (Geldreich *et al.*, 1976). Cette approche a été critiquée dans la littérature scientifique, dû à la persistance supérieure des entérocoques dans l'environnement par rapport aux coliformes thermotolérants. Cette méthode n'est donc généralement plus acceptée comme méthode efficace pour la détermination de l'origine de la contamination (Field et Samadpour, 2007, Sinton *et al.*, 1998).

Dans les années 1980, une discipline scientifique en émergence connue sous les noms de «dépistage des source de pollution microbienne» (DSPM) ou «méthodes de suivi des sources microbiennes» («*microbial source tracking*» (MST) en anglais), s'est développée (Mara et Oragui, 1981). Le suivi de la source de contamination microbienne est basé sur le concept selon lequel certaines caractéristiques microbiologiques, biochimiques ou chimiques de la contamination fécale permettent d'identifier l'espèce (ou le groupe d'espèce) qui est à l'origine de la contamination. En effectuant la comparaison entre les caractéristiques propres à une espèce hôte, il est théoriquement possible d'identifier l'organisme qui est à l'origine de la contamination. Par exemple, l'identification d'une bactérie spécifique à l'humain dans un cours d'eau permettrait d'identifier l'humain comme origine de la contamination. Plusieurs méthodes ont été étudiées et elles ont évolué grandement depuis les premières publications grâce aux avancés en microbiologie et biologie moléculaire. Certaines méthodes sont quantitatives et peuvent permettre de déterminer la proportion de la contamination fécale qui est causée par

un organisme (Field et Samadpour, 2007). Généralement, les méthodes de suivi des sources de contamination microbiennes peuvent être classifiées en cinq grandes classes :

- méthodes dépendantes de la culture et d'une banque de matériel microbien de référence;
- méthodes indépendantes de la culture et dépendantes d'une banque de matériel microbien de référence;
- méthodes dépendantes de la culture et indépendantes d'une banque de matériel microbien de référence;
- méthodes indépendantes de la culture et indépendantes d'une banque de matériel microbien de référence;
- méthodes chimiques.

Ces cinq groupes de méthodes ainsi que leurs applicabilités seront décrites dans les sections suivantes.

## **2. Détermination des sources de contamination fécale de l'eau**

### **2.1 Méthodes dépendantes de la culture et d'une banque de matériel microbien de référence**

Les premières approches qui ont été développées pour le suivi de l'origine de la contamination fécale ont été les méthodes qui sont dépendantes de la culture de micro-organismes et d'une banque de matériel microbien de référence. Ces techniques sont basées sur l'hypothèse selon laquelle certaines bactéries retrouvées dans les fèces auraient des caractéristiques (phénotypiques ou génotypiques) différenciables selon l'organisme hôte. À partir d'une banque de matériel microbien isolé des fèces des organismes hôtes d'intérêt, il serait possible de déterminer l'organisme qui est à l'origine de la contamination en faisant une comparaison entre les caractéristiques des isolats environnementaux et ceux de référence. La plupart des études publiées sur cette méthode utilisent les bactéries indicatrices de contamination fécale telles qu'*E. coli* et les entérocoques comme cible microbiologique. Bien que ces bactéries soient présentes dans les intestins de la plupart des organismes endothermes, il peut y avoir suffisamment de différences entre les isolats pour faire une différenciation à l'aide des

techniques de culture microbienne. Des caractéristiques phénotypiques et génotypiques ont été utilisées pour faire le suivi de la contamination fécale.

### **2.1.1 Caractérisation phénotypique**

Parmi les méthodes phénotypiques, la méthode du profil de résistance aux antibiotiques est probablement celle qui a été la plus utilisée. Cette approche repose sur le fait que les bactéries de la flore intestinale des humains et des animaux d'élevage sont souvent exposées à plusieurs antibiotiques. L'exposition aux antibiotiques peut induire une résistance microbiologique. Ainsi, il est possible d'incuber des plaques de pétri avec des isolats d'*E. coli* provenant de fèces de différentes espèces. L'ajout de plusieurs antibiotiques à différentes concentrations aux plaques de pétri permet d'établir un profil de résistance aux antibiotiques pour les isolats. Puisque les humains et les animaux sont exposés à des antibiotiques différents, il est possible d'établir une banque de matériel microbien de référence pour les différents organismes hôtes. On peut ensuite comparer le profil de résistance aux antibiotiques de bactéries isolées dans l'eau (échantillons inconnus) avec la banque de matériel microbien de référence (échantillons connus). Les bactéries présentant le même profil de résistance selon des analyses statistiques devraient théoriquement provenir de la même espèce ou du même groupe d'espèces hôtes (Edge *et al.*, 2005, Graves *et al.*, 2002, Harwood *et al.*, 2000, Harwood *et al.*, 2003). Puisque les animaux sauvages ne sont pas exposés directement aux antibiotiques, cette technique pourrait permettre de faire la différenciation entre la contamination fécale qui provient des humains et des animaux d'élevage et celle qui provient des animaux sauvages.

Une autre approche phénotypique est le profilage de l'utilisation du carbone. Les communautés bactériennes peuvent être différenciées selon le métabolisme de certaines sources de carbone (Haack *et al.*, 1995). Cette approche a été appliquée pour faire le suivi de l'origine de la contamination fécale selon l'hypothèse que les bactéries qui colonisent l'intestin des organismes hôtes pourraient être adaptées pour certaines sources de carbone (Hagedorn *et al.*, 2003). La banque de matériel microbien de référence est établie en faisant la croissance des isolats en présence de différents substrats pour étudier la consommation des différentes sources de carbone. Plusieurs plaques commerciales ont été développées pour faire l'analyse du profilage de l'utilisation des sources de carbone, notamment le système Biolog et le système PhenePlate.

Ces deux systèmes utilisent une plaque avec un puits pour chaque substrat. La croissance est détectée par un lecteur de plaques automatique selon un test colorimétrique, ce qui permet de faire des analyses rapides du profil d'utilisation des sources de carbone (Kühn *et al.*, 2003, Miller et Rhoden, 1991). Ces méthodes ont permis d'identifier l'origine de la contamination fécale dans plusieurs études (Hagedorn *et al.*, 2003, Harwood *et al.*, 2003, Moussa et Massengale, 2008).

Le profilage d'esters méthyliques d'acides gras est une autre méthode phénotypique qui peut permettre d'identifier la source de la contamination. Cette technique repose sur le fait que la composition en acides gras de la paroi des bactéries intestinales peut être différente selon leur organisme hôte. Les esters méthyliques d'acides gras font partie des acides gras qui peuvent permettre de faire la différenciation entre les organismes hôtes. L'analyse des esters méthyliques d'acides gras est généralement effectuée avec la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et ils sont séparés selon leurs propriétés structurales (Duran *et al.*, 2006, Seurinck *et al.*, 2006).

### **2.1.2 Caractérisation génotypique**

La caractérisation génotypique est une approche qui consiste à établir une empreinte génétique des micro-organismes pour déterminer l'origine de la contamination. Cette méthode est basée sur le fait que les bactéries ont un degré d'adaptation pour leur organisme hôte, ce qui devrait être représenté génétiquement. Comme pour les méthodes phénotypiques, une étape de culture microbienne est effectuée. Elle est généralement suivie d'une extraction d'ADN et parfois d'un clivage de l'ADN par des enzymes de restriction. L'application de certains protocoles de PCR suivie de la visualisation des résultats par électrophorèse permet de générer une empreinte génétique de l'isolat. L'identification est effectuée par la comparaison entre l'empreinte génétique de l'isolat environnemental et les isolats de la banque de matériel microbien de référence (Myoda *et al.*, 2003).

Une des méthodes génotypiques est l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE-*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Pour cette méthode, l'ADN génomique de l'isolat est clivé par une enzyme de restriction. L'enzyme de restriction utilisée pour cette méthode clive l'ADN en larges fragments, ce qui est essentiel pour cette méthode. Les fragments d'ADN sont migrés sur gel d'agarose en utilisant un champ électrique pulsé qui alterne en orientation, ce qui permet de

séparer les fragments et d'obtenir une empreinte génétique de l'isolat. Les fragments sont généralement migrés pendant une longue période par rapport aux autres techniques génotypiques (<40h) (Casarez *et al.*, 2007, Meays *et al.*, 2004).

La PCR de séquences répétitives (REP-PCR) utilise un protocole d'amplification de régions répétitives dans le génome bactérien. L'amplification de régions répétitives produit des amplicons de différentes longueurs qui sont uniques à chaque isolat. Les amplicons sont ensuite migrés par électrophorèse sur gel d'agarose pour faire l'identification de l'isolat (Dombek *et al.*, 2000). Différentes régions ont été ciblées par des amorces chez *E. coli*, notamment les régions BOX, les régions ERIC et les régions REP (Carson *et al.*, 2003, Mohapatra *et al.*, 2008).

Le ribotypage est une méthode qui différencie les isolats bactériens selon leurs séquences du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S et 23S ou des régions à proximité de ces gènes. Des enzymes de restriction sont utilisées pour cliver l'ADN génomique en fragments de différentes longueurs qui sont séparés selon leur taille avec l'électrophorèse sur gel d'agarose. Un transfert d'ADN sur une membrane (*Southern blot*) à partir des bandes du gel d'agarose est effectué, suivie d'une hybridation avec des sondes marquées. Les sondes se lient à certaines séquences de l'ADN ribosomal des bactéries et le patron obtenu par la détection des sondes permet d'obtenir une empreinte unique de l'isolat (Bouchet *et al.*, 2008, Carson *et al.*, 2003, Nelson *et al.*, 2008). Des protocoles ont été développés en utilisant une seule enzyme de restriction, soit *HindIII* (Moore *et al.*, 2005). D'autres études ont utilisé les deux enzymes de restriction *EcoRI* et *PvuII* (Samadpour *et al.*, 2005). Certaines méthodes commerciales permettent d'automatiser le ribotypage (généralement avec l'enzyme *PstI*), ce qui augmente la reproductibilité et la rapidité des analyses (Price *et al.*, 2002).

### **2.1.3 Avantages et désavantages des méthodes dépendantes de la culture et d'une banque de matériel microbien de référence**

Malgré la publication de plusieurs études démontrant le potentiel de ces méthodes, il existe plusieurs problèmes qui en limitent l'utilisation. Premièrement, l'usage des antibiotiques peut varier grandement selon la géographie des sites étudiés, ce qui va affecter l'utilité de la méthode du profilage de résistance aux antibiotiques. En effet, certains antibiotiques sont utilisés uniquement en médecine vétérinaire dans certaines régions. Dans d'autres régions, ils

sont utilisés chez les humains ainsi qu'en médecine vétérinaire, ce qui fait en sorte qu'il peut y avoir une instabilité géographique du profilage de résistance aux antibiotiques (Ebdon *et al.*, 2006). Les bibliothèques de matériel microbien doivent donc être établies localement pour qu'elles soient représentatives. Ainsi, chaque étude de suivi de l'origine de la contamination doit établir une nouvelle banque de matériel de référence pour faire l'analyse du profil de résistance. La résistance aux antibiotiques chez les bactéries est souvent induite par les plasmides, ce qui fait en sorte que la résistance peut être instable parmi les populations microbiennes. Avec le temps, la résistance aux antibiotiques peut être perdue ou gagnée par transfert horizontal, ce qui peut entraîner des faux positifs ou des faux négatifs. Malgré le fait que les animaux sauvages ne sont pas directement exposés aux antibiotiques, ils peuvent tout de même être exposés de façon indirecte puisque les antibiotiques peuvent se retrouver dans l'eau. Les bactéries isolées de ces animaux pourraient donc présenter le même profil de résistance aux antibiotiques que celui retrouvé chez les humains (Meays *et al.*, 2004).

L'analyse du profilage de la résistance aux antibiotiques présente certains avantages par rapport aux autres méthodes de suivi de l'origine de la contamination, puisqu'elle utilise des techniques de base qui peuvent être réalisées par la plupart des laboratoires de microbiologie et qui ne requièrent pas d'équipements ou de formation spécialisés. Les coûts associés à cette méthode sont généralement moins élevés que ceux associés aux méthodes génotypiques. L'efficacité du profilage de la résistance aux antibiotiques pour la détermination de l'organisme hôte peut varier grandement selon la taille de la banque de matériel microbien et de l'organisme indicateur utilisé. Certaines études ont démontré un pouvoir relativement faible de détermination de l'origine de la contamination. Dans une étude publiée en 2003, la moyenne du taux de classification conforme pour distinguer une contamination humaine d'une contamination animale variait de 65% à 81% et ce, en utilisant des analyses d'échantillons à l'aveugle (Wiggins *et al.*, 2003). Dans une étude publiée par un consortium de recherche, cette approche a été critiquée en raison d'un manque de reproductibilité des résultats et d'un nombre élevé de faux positifs. Le taux de faux positifs pour la classification humaine était de 39%, ce qui rend cette technique peu pratique (Harwood *et al.*, 2003). La détermination de l'origine de la contamination au moyen de cette méthode est particulièrement difficile lorsqu'il y a des sources mixtes de contamination. De plus, les taux de classification conformes pour

l'identification des différentes espèces animales individuelles sont généralement bas (Harwood *et al.*, 2003, Moore *et al.*, 2005).

En comparaison avec le profilage de résistance aux antibiotiques, le profilage de consommation du carbone est généralement plus performant pour la détermination de l'origine de la contamination. Le taux de classification conforme pour l'humain dans une étude publiée en 2008 était de 86,7% avec un taux de faux positifs de 2,7% pour l'identification de sources mixtes (Moussa et Massengale, 2008). Par contre, dans une étude publiée par un consortium de recherche en 2003, le niveau de faux positifs était de 51,5% à 66,7%, malgré un taux de classification conforme de 73,3% à 93,3% en utilisant des sources mixtes (Harwood *et al.*, 2003). Un avantage de cette méthode est la possibilité d'automatisation grâce aux plaques et aux lecteurs de plaques commerciaux. Ceci permet d'augmenter la reproductibilité des analyses et d'établir une standardisation des méthodes. Comme dans le cas du profilage de résistance aux antibiotiques, le profilage de consommation du carbone est une méthode simple et peut être effectuée sans expertise particulière. Par contre, l'utilisation de plaques et de lecteurs commerciaux pour l'automatisation est plus coûteuse que le profilage de résistance aux antibiotiques. Le nombre d'études disponibles sur l'évaluation et l'applicabilité de cette méthode est limité par rapport aux autres méthodes de suivi de l'origine de la contamination. Cette méthode est aussi affectée par le manque de stabilité géographique et temporelle des isolats.

Le profilage d'esters méthyliques d'acides gras est une méthode sensible et généralement performante. Selon une étude publiée en 2006, le taux de classification conforme était de 99% (Duran *et al.*, 2006). Par contre, cette méthode est coûteuse et requiert une expertise en instrumentation pour l'analyse par HPLC des acides gras. Le nombre d'études publiées sur l'application de cette méthode à grande échelle demeure toutefois très limité.

En général, les méthodes génotypiques sont plus coûteuses, laborieuses et complexes que les méthodes phénotypiques. Ces méthodes demandent aussi une expertise ainsi que du matériel de laboratoire spécialisé afin d'obtenir des résultats reproductibles. Les méthodes génotypiques ont cependant un plus grand potentiel pour l'identification de la source de la contamination et elles sont généralement plus sensibles que les méthodes phénotypiques.

L'électrophorèse sur gel en champ pulsé est une méthode sensible et reproductible. Par contre, elle est plus longue que les autres méthodes génotypiques, dû notamment à l'étape de migration sur gel qui peut prendre 40h. Dans une étude publiée en 2003, le taux de classification conforme pour cette méthode était de 81% avec un taux de faux positifs de 17% en utilisant des sources mixtes (Myoda *et al.*, 2003). Dans une deuxième étude aussi publiée en 2003, le taux de classification conforme était d'environ 75% alors que le taux de faux positifs était très élevé, soit de 50%, en utilisant des sources mixtes (Griffith *et al.*, 2003). Cette méthode demande une plus grande quantité d'isolats afin d'établir une banque de matériel microbien représentative en comparaison avec les autres méthodes génotypiques.

Parmi les méthodes génotypiques, la PCR de séquences répétitives est la méthode la plus simple à effectuer et ne demande pas d'appareils spécialisés. L'efficacité de cette méthode dépend grandement de la paire d'amorces utilisée pour cibler les régions répétitives. Les taux de classifications conformes étaient élevés avec des sources mixtes selon une étude utilisant la région BOXA1R (86%-90%). Par contre, le niveau de faux positifs était aussi élevé (38%-52%) (Myoda *et al.*, 2003). Dans une deuxième étude, le taux de classification conforme était élevé (87.8%) en utilisant la région répétitive (GTG)<sub>(5)</sub> (Mohapatra *et al.*, 2007).

Le ribotypage est la méthode génotypique qui demande le plus d'équipement et d'expertise spécialisés. Cette méthode est particulièrement laborieuse, notamment en raison de l'étape de transfert sur membrane et de la détection par les sondes. L'efficacité de cette méthode peut dépendre du protocole qui est utilisé. Dans une étude publiée en 2003 par un consortium de recherche, le taux de classification correcte a été comparé entre deux protocoles de ribotypage. La première analyse a été effectuée avec les enzymes *EcoRI* et *PvuII* et la deuxième avec l'enzyme *PstI*. Le taux de classification conforme avec des sources mixtes en utilisant les deux enzymes était de 81% à 100% avec un taux de faux positifs de 23% à 57%. Le taux de classification conforme avec l'enzyme *PstI* était comparable (86%), mais avec un niveau plus faible de faux positifs (17%) (Myoda *et al.*, 2003). Dans une deuxième étude publiée en 2003, le taux de classification conforme pour le ribotypage en utilisant l'enzyme *HindIII* était de 75%. Par contre, le taux de faux positifs pour la classification de la contamination humaine était de 70% (Griffith *et al.*, 2003).

La nécessité de faire la culture et d'établir une banque de matériel microbien de référence limite l'applicabilité des méthodes phénotypiques et génotypiques. En effet, seules les bactéries qui sont facilement cultivables (telles que les bactéries indicatrices de contamination fécale) peuvent être utilisées. La culture de bactéries induit certains biais de sélection, ce qui affecte la représentation de la population microbienne qui croît à partir de l'isolat. Établir une banque de matériel microbien de référence est un processus long et coûteux. La stabilité géographique et temporelle de la banque doit être prise en considération pour que les résultats soient significatifs. Il est donc nécessaire d'établir une nouvelle banque de matériel microbien pour chaque analyse de suivi de la contamination. La quantité d'isolats nécessaire pour établir une banque de matériel microbien peut varier selon la méthode utilisée. Il n'existe présentement aucune méthode standardisée par rapport à la quantité d'isolats requis pour établir la banque de matériel microbien.

Les méthodes dépendantes de la culture d'une banque de matériel microbien sont presque toujours plus performantes pour identifier la contamination humaine par rapport à la contamination animale. Elles sont par contre moins performantes pour faire la détection de chaque animal individuel. Lorsqu'il y a plusieurs sources de contamination dans un même site, la détection devient particulièrement difficile. Ces méthodes nécessitent des analyses statistiques qui peuvent être particulièrement complexes.

Ces méthodes ont par contre un avantage important par rapport aux méthodes indépendantes de la culture et d'une banque de matériel microbien. En effet, elles utilisent les bactéries indicatrices de contamination fécale afin de déterminer l'origine de la contamination. Il pourrait donc être plus facile d'intégrer les résultats de ces méthodes dans les résultats de la détection traditionnelle de bactéries indicatrices de contamination fécale, ce qui est l'approche utilisée présentement. Il serait aussi plus facile d'établir des standards ou des normes pour l'utilisation de l'eau, étant donné qu'elles ont déjà été établies avec les bactéries indicatrices de contamination fécale. Plusieurs études ont été effectuées sur la corrélation des bactéries indicatrices de contamination fécale et de micro-organismes pathogènes. Avec les méthodes dépendantes de la culture d'une banque de matériel microbien de référence, il pourrait donc être plus facile de relier les résultats de ces analyses et les risques pour la santé humaine.

## 2.2 Méthodes indépendantes de la culture et d'une banque de matériel microbien de référence (méthodes moléculaires)

Les avancées en biologie moléculaire ont permis le développement de méthodes qui ne requièrent pas la culture et le développement d'une banque de matériel de référence. Ces méthodes vont cibler directement des éléments génétiques qui sont spécifiques à un organisme hôte. Généralement, ces méthodes utilisent la filtration d'un échantillon d'eau pour concentrer la biomasse. L'ADN est extrait à partir du filtre et est analysé par PCR pour amplifier des marqueurs génétiques. Plusieurs marqueurs ont été étudiés, notamment des bactéries du genre *Bacteroides*, l'ADN mitochondrial et des virus.

Pour qu'un marqueur génétique soit considéré comme étant idéal, il devrait répondre à certains critères (Harwood *et al.*, 2011). Premièrement, un marqueur devrait être retrouvé uniquement chez la population hôte d'intérêt (spécificité) et non chez les autres espèces. La distribution du marqueur devrait être parfaite dans la population hôte, c'est-à-dire que le marqueur devrait être présent chez tous les organismes qui font partie de la population hôte. Un marqueur idéal devrait aussi être quantifiable et la quantification devrait être directement représentative du volume de la contamination. Le marqueur devrait donc être présent en quantité égale au sein de la population hôte. De plus, la quantité du marqueur retrouvé chez les organismes hôtes devrait être stable à travers le temps et le marqueur devrait être stable géographiquement. La persistance du marqueur devrait être constante et prévisible à travers le temps sans être affectée par l'environnement. En plus des critères susmentionnés, la présence du marqueur devrait être corrélée avec la présence de micro-organismes pathogènes pour que le marqueur soit indicateur du risque pour la santé humaine.

Il n'existe présentement aucun marqueur génétique qui peut répondre à tous ces critères. Par contre, un marqueur génétique peut quand même être utile pour la détermination de l'origine de la contamination s'il répond en partie à certains des critères énoncés. Par exemple, la présence d'un marqueur chez 70% d'une population hôte est probablement suffisante pour la détection malgré le fait que le marqueur n'est pas présent pour la totalité de la population hôte. Même si la détection de certains marqueurs n'est pas quantitative, la présence ou l'absence d'un marqueur peut quand même être suffisante pour les besoins des analyses. Le degré d'activité des populations microbiennes peut faire varier la quantité retrouvée d'un marqueur

chez les organismes hôtes. Par contre, ces variations au niveau de chaque individu n'auront pas nécessairement d'impacts majeurs sur l'efficacité du marqueur, puisque la détection de la contamination est effectuée au niveau de la population hôte et est donc moins affectée par ces variations au niveau individuel. L'approche privilégiée dans la littérature scientifique consiste à utiliser plusieurs marqueurs en parallèle, ce qui est communément appelé l'approche par boîte à outils (Stoeckel et Harwood, 2007).

Une approche couramment utilisée est l'amplification de gènes de bactéries associées à un organisme hôte. Parmi les bactéries qui colonisent l'intestin des mammifères, le genre bactérien dominant est *Bacteroides*. Ce genre bactérien peut représenter jusqu'à 30% de toutes les bactéries intestinales chez l'humain (Salysers, 1984). Puisqu'elles sont présentes en grande quantité dans les fèces, ces bactéries ont le potentiel d'être utilisées pour la détection de la contamination fécale. Étant donné que les bactéries du genre *Bacteroides* sont généralement strictement anaérobies, leur isolement peut cependant être très difficile. Avec les techniques de biologie moléculaire, il est possible de cibler directement l'ADN de ces bactéries en évitant l'étape de l'isolement. Plusieurs études ont démontré la spécificité de bactéries associées au genre *Bacteroides*, et cette approche est généralement la plus utilisée dans la littérature scientifique (Layton *et al.*, 2013). Les premières études ont ciblé les séquences du gène de l'ARN ribosomal 16S comme marqueurs génétiques. Grâce aux analyses d'hétérogénéité de longueur de séquences isolées à partir des organismes hôtes, il a été possible d'identifier des séquences retrouvées de façon spécifique chez certains organismes hôtes. À partir des séquences spécifiques, des amorces pour la PCR ont été développées, ce qui permet de trouver l'origine de la contamination (Bernhard *et al.*, 2000, Dick *et al.*, 2005, Green *et al.*, 2012, Haugland *et al.*, 2010). Les séquences de protéines de surface de *Bacteroides* ont aussi été étudiées comme marqueurs génétiques potentiels, puisque ces séquences ont souvent un degré d'adaptation pour leur organisme hôte (Shanks *et al.*, 2008, Shanks *et al.*, 2009).

D'autres micro-organismes ont été utilisés pour déterminer l'origine de la contamination fécale. Les archées méthanogènes *Methanobrevibacter smithii* et *Methanobrevibacter ruminantium* ont été étudiées comme marqueurs potentiels pour l'humain et pour les ruminants, respectivement (Johnston *et al.*, 2013, Ufnar *et al.*, 2006, Ufnar *et al.*, 2007). Une étude publiée en 2012 a

démontré la spécificité de *Catelliboccus marimammalium*, une bactérie à Gram positif, dans la détection de la contamination fécale des goélands (Ryu *et al.*, 2012).

Une autre cible génétique pour déterminer l'origine de la contamination fécale est l'ADN mitochondrial. Cette approche propose d'aller cibler directement un élément eucaryote de l'organisme hôte, l'ADN mitochondrial, plutôt que de cibler l'ADN de bactéries associées à un organisme hôte. L'ADN mitochondrial est un génome circulaire d'environ 16 000 à 18 000 pb chez les vertébrés qui est indépendant de l'ADN génomique. Les parois de l'intestin sont composées de cellules épithéliales et chacune de ces cellules comporte plusieurs mitochondries. Chaque mitochondrie possède plusieurs copies d'ADN mitochondrial. Par phénomène apoptotique, les cellules épithéliales de l'intestin sont continuellement relâchées et se retrouvent dans les fèces en grande quantité (Caldwell *et al.*, 2011, Caldwell *et al.*, 2007). Des amorces ont été développées pour cibler des régions de l'ADN mitochondrial qui sont spécifiques et ainsi identifier l'origine de la contamination. Cette approche a été appliquée pour détecter la contamination fécale qui provient des humains, des animaux d'élevage et des animaux domestiques (Caldwell *et al.*, 2009, Caldwell *et al.*, 2007, Kortbaoui *et al.*, 2009, Martellini *et al.*, 2005, Tambalo *et al.*, 2012, Villemur *et al.*, 2014, Vuong *et al.*, 2013).

Plusieurs types de virus ont été utilisés comme marqueurs génétiques spécifiques. La plupart des virus retrouvés dans les fèces sont adaptés à leur organisme hôte et dans les cas des bactériophages, ceux-ci sont adaptés à une bactérie spécifique. Ils constituent donc une bonne cible génétique pour déterminer la source de la contamination. Trois groupes de virus ont été utilisés, notamment les polyomavirus humains (HPyVs), les adénovirus et les bactériophages.

Les polyomavirus humains sont des virus à ADN qui sont retrouvés en grande quantité dans les fèces et l'urine des humains. La détection simultanée de deux polyomavirus humains par PCR a permis d'effectuer la détection de la contamination fécale humaine (McQuaig *et al.*, 2006). Une corrélation entre ces virus et certains marqueurs de *Bacteroides* spécifiques à l'humain a été établie (McQuaig *et al.*, 2009).

Certains adénovirus ont une spécificité pour un organisme hôte. Ils ont été utilisés comme marqueurs chez l'humain, les bovins et les porcins (Hundesha *et al.*, 2009, Maluquer de Motes *et al.*, 2004, Spilki *et al.*, 2013).

Les coliphages sont des virus qui infectent la bactérie *E. coli*. Certains sous-types sont associés à l'humain (Cole *et al.*, 2003, Wolf *et al.*, 2010). Des bactériophages spécifiques à l'humain qui infectent *Bacteroides* ont aussi été détectés (Ebdon *et al.*, 2007).

### **2.2.1 Avantages et désavantages des méthodes indépendantes de la culture et d'une banque de matériel microbien de référence**

Plusieurs micro-organismes anaérobies spécifiques à un organisme hôte ont été identifiés et ont été évalués quant à leur efficacité pour la détermination de l'origine de la contamination. Ces méthodes qui utilisent la PCR ou la qPCR sont très simples et peuvent être effectuées sans expertise spécialisée. L'efficacité de cette approche peut dépendre du marqueur sélectionné pour l'amplification par PCR. Deux études majeures ont été publiées en 2013 par des consortiums de recherche sur l'efficacité de marqueurs génétiques pour la détermination de l'origine de la contamination fécale. Parmi les marqueurs évalués, les deux études ont déterminé qu'un des marqueurs du gène ARN ribosomal 16S de *Bacteroides* associé à l'humain, nommé HF183, était particulièrement efficace pour la détection de la contamination fécale humaine. Le niveau élevé du taux de classification conforme (>80%) ainsi que le bas niveau de faux positifs (<20%) en fait présentement l'un des meilleurs marqueurs génétiques de contamination fécale. Ce marqueur s'est aussi distingué pour sa stabilité géographique ainsi que sa sensibilité. (Boehm *et al.*, 2013, Green *et al.*, 2014, Harwood *et al.*, 2009, Layton *et al.*, 2013). Chez les ruminants, le marqueur Rum2Bac a obtenu un haut niveau de classification conforme (>80%) et un faible niveau de faux positifs (<20%) (Boehm *et al.*, 2013).

Il peut y avoir certaines limitations par rapport à l'utilisation de micro-organismes spécifiques à un organisme hôte comme marqueurs de contamination. En effet, la spécificité ainsi que la quantité de ces micro-organismes peuvent être variables. Certains marqueurs tels que le marqueur BacCow avaient initialement été décrits comme étant très spécifiques pour les vaches, alors que le marqueur a été détecté dans les fèces des huit espèces animales dans une étude subséquente (Boehm *et al.*, 2013, Kildare *et al.*, 2007). Les croisements entre les bactéries intestinales des organismes hôtes est un phénomène observé chez les espèces qui ont des contacts rapprochés comme les humains et les animaux de compagnie, ce qui peut fausser les résultats (Dick *et al.*, 2005). Des bactéries spécifiques associées au genre *Bacteroides* ont été identifiées chez une quantité limitée d'organismes hôtes. Pour plusieurs espèces d'animaux

sauvages, il n'existe présentement aucun marqueur génétique bactérien disponible pour déterminer l'origine de la contamination (Field et Samadpour, 2007, Wuertz *et al.*, 2011).

L'utilisation de l'ADN mitochondrial comme marqueur génétique spécifique de la contamination fécale comporte plusieurs avantages. Alors que la spécificité de certaines bactéries pour un organisme hôte peut être grandement variable, l'ADN mitochondrial est un élément génétique propre à l'organisme et est donc absolument spécifique. L'ADN mitochondrial est présent chez tous les organismes hôtes, ce qui n'est pas toujours le cas avec les bactéries spécifiques. Étant donné la grande quantité de génomes d'ADN mitochondrial qui ont été séquencés, il est possible de développer des amorces qui amplifient des régions spécifiques pour chacun de ces organismes.

L'utilisation de l'ADN mitochondrial comme marqueur génétique spécifique présente cependant certains désavantages et limitations. L'ADN mitochondrial n'indique pas toujours directement une contamination fécale. En effet, la peau relâche aussi une grande quantité d'ADN mitochondrial. Un échantillon d'eau prélevé à proximité d'une plage pourrait donc contenir une grande quantité d'ADN mitochondrial, sans qu'il y ait de contamination fécale. Un soin particulier doit être pris lors de l'échantillonnage et des analyses par PCR de la contamination humaine pour ne pas contaminer les échantillons avec l'ADN mitochondrial du personnel de laboratoire. Malgré le fait que l'ADN mitochondrial contienne plusieurs régions uniques pour l'espèce hôte, de faux positifs peuvent tout de même être obtenus, notamment si les amorces ne sont pas conçues en prenant soin d'éviter des régions conservées. Il est donc important d'effectuer des tests d'amplification sur l'ADN d'autres espèces animales pour vérifier la spécificité des amorces. La quantité de copies d'ADN mitochondrial retrouvée dans l'eau est généralement plus faible que la quantité de bactéries spécifiques telles que *Bacteroides*. La détection peut donc être plus difficile. Pour remédier à ce problème, un volume d'eau supérieur pour la filtration peut être utilisé. Des protocoles ont été élaborés pour utiliser la PCR en niche ce qui permet d'obtenir une meilleure sensibilité des analyses. Dans certaines conditions, l'ADN mitochondrial retrouvé dans la viande peut résister à la digestion des humains et se retrouver dans les fèces à un niveau détectable. Étant donné que ce niveau d'ADN mitochondrial étranger est très faible, il est peu probable que cette situation ait un impact réel sur la détection de la contamination (Caldwell *et al.*, 2011, Caldwell *et al.*, 2007, Martellini *et al.*, 2005). Dans une

étude publiée en 2013, l'ADN mitochondrial utilisé comme marqueur génétique était spécifique et sensible pour la détection de l'espèce porcine (Boehm *et al.*, 2013).

Certains virus utilisés comme marqueurs génétiques sont des micro-organismes pathogènes pour l'humain et ils ont donc l'avantage d'être directement indicateurs du risque pour la santé humaine. La plupart des virus sont retrouvés en quantité plus faible par rapport aux bactéries telles que *Bacteroides*. Un volume d'eau plus élevé doit souvent être utilisé pour augmenter la sensibilité de ces méthodes. Dans les deux études publiées en 2013 sur l'efficacité des marqueurs génétiques, les polyomavirus humains étaient hautement spécifiques (100%), mais cette méthode était peu sensible (Boehm *et al.*, 2013, Harwood *et al.*, 2013). Les analyses avec les adénovirus spécifiques ont donné des résultats similaires aux polyomavirus, c'est-à-dire avec un degré de spécificité élevé, mais une sensibilité relativement faible (Boehm *et al.*, 2013, Harwood *et al.*, 2013). Les analyses utilisant des bactériophages et coliphages permettent d'obtenir une meilleure sensibilité, puisque ces virus sont présents en plus grande quantité. Par contre, la spécificité de ces méthodes est plus faible (Boehm *et al.*, 2013, Harwood *et al.*, 2013).

En général, les méthodes indépendantes de la culture et indépendantes d'une banque de matériel microbien de référence sont simples, peu coûteuses, rapides et peuvent être effectuées avec une quantité limitée d'équipements spécialisés tels qu'un thermocycleur et un thermocycleur en temps réel. Ces méthodes ne requièrent pas de banque de matériel microbien de référence, ce qui facilite les expériences. Cette méthode ne souffre pas du biais pouvant être causé par la culture des micro-organismes. Plusieurs des marqueurs génétiques qui ont été identifiés sont à la fois stables géographiquement et spécifiques. Certaines analyses par des consortiums de recherche ont démontré que les résultats des analyses de marqueurs génétiques étaient reproductibles. Ces méthodes ont moins tendance à être affectées par des sources de contamination mixtes grâce à la spécificité de la PCR. Malgré le fait que ces méthodes n'utilisent pas de banque de matériel microbien de référence, les marqueurs devraient tout de même être évalués pour leur spécificité et pour leur stabilité géographique afin de confirmer leur pertinence dans le site étudié. Certaines molécules inhibitrices de la réaction PCR peuvent également induire une perte de sensibilité ainsi que des faux positifs dans les analyses visant à déterminer la source de la contamination. Cette situation est particulièrement problématique pour les méthodes qui ont besoin de concentrer un grand

volume d'eau, ce qui a pour effet d'augmenter la concentration de molécules inhibitrices dans les échantillons (Boehm *et al.*, 2013, Field et Samadpour, 2007, Harwood *et al.*, 2013, Layton *et al.*, 2013, Wuertz *et al.*, 2011).

### **2.3 Méthodes dépendantes de la culture et indépendantes d'une banque de matériel microbien de référence**

Les méthodes dépendantes de la culture et indépendantes d'une banque de matériel microbien de référence sont des méthodes qui ont une étape d'enrichissement microbien pour augmenter le niveau du microorganisme cible. Cette approche a été appliquée avec l'utilisation du coliphage à ARN F+ dont les sous-groupes II et III sont spécifiques pour l'humain, alors que les sous-groupes I et IV sont spécifiques aux animaux. La détermination du sous-groupe est effectuée avec une méthode génotypique ou par PCR (Field et Samadpour, 2007, Stewart-Pullaro *et al.*, 2006).

#### **2.3.1 Avantages et désavantages des méthodes dépendantes de la culture et indépendantes d'une banque de matériel microbien de référence**

L'avantage des méthodes dépendantes de la culture et indépendantes d'une banque de matériel microbien de référence est qu'elles permettent d'augmenter le niveau du microorganisme cible grâce à l'étape de culture initiale. Généralement, cette approche appliquée au typage de coliphages à ARN F+ donne des résultats variables. Ceci est dû à la représentation variable des sous-groupes de coliphages à ARN F+ chez les humains (Field et Samadpour, 2007).

### **2.4 Méthodes indépendantes de la culture et dépendantes d'une banque de matériel microbien de référence**

La plupart des méthodes indépendantes de la culture et dépendantes d'une banque de matériel microbien sont des analyses de communautés microbiennes. Ces méthodes consistent à extraire l'ADN total d'un échantillon et à analyser les séquences pour obtenir une empreinte génétique de la communauté microbienne. La plupart des études ont utilisé l'approche de polymorphisme de longueur de fragments de restriction terminaux appliquée aux régions conservées du gène de l'ARN ribosomal 16S (Field et Samadpour, 2007).

#### **2.4.1 Avantages et désavantages des méthodes indépendantes de la culture et dépendantes d'une banque de matériel microbien de référence**

Les méthodes indépendantes de la culture et dépendante d'une banque de matériel microbien de référence telles que les analyses des communautés bactériennes n'ont pas été appliquées à grande échelle. Ces méthodes sont complexes à effectuer et sont toujours au stade de développement (Cao *et al.*, 2011, Field et Samadpour, 2007). Malgré le fait que ces méthodes possèdent un potentiel intéressant dans la détection de la contamination fécale, les résultats initiaux de ces méthodes ont été négatifs (Griffith *et al.*, 2003).

### **2.5 Marqueurs chimiques**

La détection de certains composés chimiques peut permettre de déterminer l'origine de la contamination. Quatre groupes de composés chimiques ont été utilisés comme indicateur de contamination : la caféine et les métabolites de la caféine, les produits pharmaceutiques, les produits blanchissants et les stanols et stérols fécaux (Hagedorn *et al.*, 2011). Puisque la consommation de la caféine est exclusive à l'humain, la présence de celle-ci ainsi que de ses métabolites dans l'eau est indicatrice d'une contamination humaine (Daneshvar *et al.*, 2012, Peeler *et al.*, 2006). Certains produits pharmaceutiques tels que la carbamazépine et l'acétaminophène sont utilisés par une proportion suffisamment importante d'individus pour être détectés dans l'eau (Sidhu *et al.*, 2013). Les produits blanchissants (azurant optique) sont souvent ajoutés au savon de lessive et aux produits cosmétiques et peuvent ainsi être détectés relativement facilement par fluorométrie (Cao *et al.*, 2009). Lors de la métabolisation du cholestérol par les animaux, des produits tels que les stanols et stérols sont formés et retrouvés dans les fèces. Le ratio de ces molécules peut être utilisé pour déterminer l'origine de la contamination (Derrien *et al.*, 2012).

#### **2.5.1 Avantages et désavantages des marqueurs chimiques**

La détection de plusieurs composés chimiques n'est pas toujours directement indicatrice de contamination fécale. En effet, certains produits chimiques tels que la caféine sont excrétés dans l'urine alors que d'autres comme les produits blanchissants vont être relâchés dans l'eau de la lessive. Par contre, la présence de ces marqueurs chimiques est tout de même indicatrice d'une contamination d'origine humaine et peut permettre d'identifier l'eau contaminée via les

égouts, par exemple. La détection de marqueurs chimiques demande presque toujours des appareils et des techniques spécialisés tels que la chromatographie en phase liquide à haute performance, la chromatographie en phase gazeuse, la spectrométrie d'absorption atomique et la spectrométrie de masse (Hagedorn *et al.*, 2011). Certains composés chimiques peuvent être détectés dans l'eau sans qu'il y ait de contamination avec de l'eau usée. Par exemple, la caféine peut être retrouvée dans l'eau, ce qui peut être expliqué par la présence de déchets associés au café (graines, moulures, etc.). Malgré ce fait, la caféine a été identifiée comme l'un des marqueurs chimiques ayant le plus grand potentiel pour la détection de la contamination humaine dans une étude publiée en 2005 (Glassmeyer *et al.*, 2005). La demi-vie variable de certains composés peut être un avantage dans la détection de la contamination. La carbamazépine a une demi-vie très longue dans l'eau (>6 mois), ce qui peut être utile pour faire la détection d'une contamination antérieure (Sauvé *et al.*, 2012). En général, les marqueurs chimiques de contamination fécale ne souffrent pas des problèmes d'instabilité géographique qui affectent les méthodes dépendantes et indépendantes d'une banque de matériel microbien de référence.

L'utilisation de marqueurs chimiques se limite généralement à faire la distinction entre la contamination humaine et animale. Par contre, l'analyse de six stanols a permis de distinguer les contaminations porcine, bovine et humaine (Derrien *et al.*, 2012). Pour la plupart des animaux sauvages, il n'existe présentement aucun marqueur chimique envisageable pour la détermination de l'origine de la contamination fécale.

### **3. Études de cas au Canada**

Quatre études de cas ont été sélectionnées afin de démontrer l'applicabilité de différentes techniques de suivi de l'origine de la contamination fécale au Canada.

#### **3.1 Étude de cas no 1: *Development and validation of a microbial source tracking marker for the detection of fecal pollution by muskrats***

**Auteurs:** Marti R., Zhang Y., Lapen D.R., Topp E., 2011

Le rat musqué est un animal semi-aquatique qui habite dans les bordures de rivières et ruisseaux à faible débit. La population de rats musqués est particulièrement élevée en bordure

des terres agricoles. Plusieurs études ont démontré que les fèces de cet animal pouvaient contenir plusieurs micro-organismes pathogènes tels que *Giardia* et *Campylobacter jejuni*. Étant donnée la forte population de cet animal, il serait donc pertinent de développer des outils pour la détection de la contamination fécale du rat musqué. Le but de cette étude était d'identifier et d'évaluer un marqueur génétique associé à l'ordre *Bacteroidales* pour la détection et la quantification de la contamination fécale causée par le rat musqué.

Premièrement, l'ADN a été extrait à partir d'échantillons de fèces du rat musqué. Une PCR universelle du gène de l'ARN ribosomal 16S de l'ordre bactérien *Bacteroidales* a ensuite été effectuée. Ces séquences ont été clonées et séquencées. Les séquences ont été alignées et un arbre phylogénétique a été établi pour regrouper les séquences. Les séquences démontrant peu de similarité avec les séquences disponibles dans Genbank ont été sélectionnées pour développer les amorces MuBa01F et MuBa01R amplifiant une région de 168pb. Une sonde TaqMan a été sélectionnée à l'intérieur de la région de 168pb pour la PCR quantitative.

Les amorces ont été mises à l'essai pour la détection et la quantification de la contamination fécale du rat musqué. Les amorces ont amplifié la région de 168pb pour 66% des échantillons de fèces du rat musqué (sensibilité). Lors de tests pour la spécificité des amorces, aucun échantillon de fèces d'animaux autres que ceux du rat musqué ont donné un signal positif pour la PCR, ce qui signifie un haut degré de spécificité (100%). La limite de quantification pour la qPCR a été établie à  $2.9 \log_{10}$  copies/100 mL d'eau.

Les chercheurs ont ensuite testé le marqueur avec des échantillons d'eau provenant du bassin versant de la Rivière Nation (South Nation River) dans l'est de l'Ontario. Vingt-deux échantillons provenant de deux sites dans le bassin versant ont été prélevés et l'ADN a été extrait à partir de ces échantillons. Ainsi, 18,2% des échantillons du premier site et 9,1% du deuxième site étaient positifs pour le marqueur spécifique au rat musqué. Les concentrations variaient de 3.0 à 4.0  $\log_{10}$  copies/100 mL d'eau.

Ce marqueur a permis de détecter et de quantifier la contamination fécale du rat musqué, une espèce qui peut avoir un impact majeur sur la qualité de l'eau dans les bassins versants du Québec.

### 3.2 Étude de cas no 2: *Quantitative real-time PCR assays for sensitive detection of Canada goose-specific fecal pollution in water sources*

**Auteurs:** Fremaux B., Boa T., Yost C.K., 2010.

La bernache du Canada est un oiseau migratoire qui peut avoir une forte population à proximité des centres urbains. Les bernaches du Canada sont souvent nourries par la population et ont tendance à s'agréger en grande quantité près des cours d'eau. Ces deux facteurs font en sorte que cet animal peut avoir un grand impact sur la qualité de l'eau. Dans cette étude, les chercheurs visaient à identifier un marqueur génétique associé à l'ordre *Bacteroidales* spécifique aux bernaches du Canada.

Premièrement, 15 échantillons de fèces provenant de bernaches du Canada ont été prélevés au lac Wascana à Regina en Saskatchewan. Le gène d'ARN ribosomal 16s a été amplifié en utilisant des amorces universelles pour l'ordre *Bacteroidales*. Un séquençage a été effectué et les séquences obtenues ont été alignées. Des séquences uniques pour les bernaches du Canada ont été identifiées en effectuant une comparaison avec des séquences provenant d'autres espèces. À partir de séquences uniques, deux paires d'amorces ont été développées pour amplifier deux séquences génétiques spécifiques soit les paires d'amorces CGOF1-*bac* et CGOF2-*bac*. Une sonde TaqMan pour faire l'amplification quantitative a aussi été développée.

Les amorces ont été testées pour leur spécificité en comparant leurs séquences aux séquences issues d'autres espèces animales. La spécificité a été testée en effectuant un test d'amplification avec de l'ADN isolé de 17 autres espèces. Aucune amplification non spécifique n'a été détectée pour la paire d'amorces CGOF2-*bac* (spécificité 100%), alors qu'une seule a été détectée pour la paire d'amorces CGOF1-*bac* (spécificité 96%). Les deux marqueurs ont obtenu une sensibilité comparable avec 57% et 50% des échantillons de fèces de bernaches du Canada qui étaient positifs pour les paires d'amorces CGOF2-*bac* et CGOF1-*bac*.

Les amorces ont ensuite été testées à partir d'échantillons d'eau prélevés au lac Wascana, souvent fréquenté par les bernaches du Canada. Des niveaux élevés de ces deux marqueurs ont été détectés pour la plupart des sites échantillonnés.

En conclusion, cette étude a démontré l'utilité de deux marqueurs génétiques de *Bacteroidales* pour la détection de la contamination fécale de la bernache du Canada.

### **3.3 Étude de cas no 3: *An environmental survey of surface waters using mitochondrial DNA from human, bovine and porcine origin as fecal source tracking markers***

**Auteurs:** Villemur R., Imbeau M., Vuong M.N., Masson L., Payment P., 2014.

Un des marqueurs génétiques utilisés pour la détection de la contamination fécale est l'ADN mitochondrial. Des amorces ont été développées pour cibler des régions spécifiques de cet élément eucaryote afin de déterminer l'origine de la contamination fécale. Par contre, l'utilisation de ce marqueur demeure une approche plus récente qui n'a pas été appliquée dans l'étude à l'échelle de bassins versants. Le but de cette étude était de détecter l'ADN mitochondrial humain, bovin et porcin dans plusieurs bassins versants. En parallèle, le décompte de coliformes thermotolérants et la quantification du marqueur *Bacteroides* HF183 spécifique à l'humain ont été effectués.

Des échantillons ont été prélevés dans les bassins versants suivants : la rivière l'Assomption (Québec), la rivière Nicolet (Québec), la rivière Boyer (Québec), le ruisseau à l'Ours (Québec), la rivière Nation (Ontario). Ces bassins versants ont été sélectionnés car ils représentent des sites affectés par la contamination fécale provenant de sources mixtes (humaines et agricoles). À partir des échantillons d'eau, un décompte des coliformes thermotolérants ainsi qu'une filtration ont été effectués. L'ADN a été extrait et la détection par PCR de marqueurs mitochondriaux et du marqueur HF183 a été effectuée.

Parmi les bassins versants étudiés, le marqueur d'ADN mitochondrial humain a été détecté dans 48% des échantillons. Le marqueur d'ADN mitochondrial bovin a été détecté dans 23% des échantillons et le marqueur d'ADN mitochondrial porcin dans 6% des échantillons. Le marqueur HF183 humain a été détecté dans 50% des échantillons. Le niveau des marqueurs humains était plus élevé lorsque les échantillons provenaient de régions urbaines alors que le niveau de marqueur bovin était plus élevé lorsque les échantillons provenaient de régions agricoles. Le niveau de marqueur bovin était particulièrement élevé à certains endroits, ce qui pourrait être attribuable à l'épandage de fumiers qui apporte une grande quantité de matières fécales

d'origine bovine. Le niveau élevé des marqueurs humain a été attribué aux fosses septiques ainsi qu'aux décharges des usines de traitement des eaux usées.

Le niveau du marqueur HF183 était supérieur au niveau de l'ADN mitochondrial humain, ce qui avait déjà été démontré dans des études précédentes. Une corrélation a été observée entre le niveau de ces deux marqueurs génétiques spécifiques à l'humain, ce qui démontre leur robustesse pour détecter la contamination fécale humaine.

En conclusion, cette étude a démontré l'applicabilité de la détection de l'ADN mitochondrial pour déterminer l'origine de la contamination fécale dans plusieurs bassins versants.

### **3.4 Étude de cas no 4: *Experience with the antibiotic resistance analysis and DNA fingerprinting in tracking faecal pollution at two lake beaches***

**Auteurs:** Edge T.A., Hill S., Stinson G., Seto P., Marsalek J., 2007.

La fermeture de plages est un problème fréquemment causé par la contamination fécale. La détection traditionnelle d'*E. coli* ne permet pas d'identifier l'origine de la contamination. La contamination fécale qui affecte les plages peut provenir de diverses sources telles que le trop-plein des égouts unitaires, les décharges des usines de traitement des eaux usées et les fèces d'animaux sauvages, de compagnie et d'élevage. Le but de cette étude était d'identifier l'origine de la contamination pour deux plages à Toronto (Ontario) en utilisant deux méthodes de suivi de l'origine de la contamination fécale dépendantes d'une banque de matériel microbien, soit le profilage de la résistance aux antibiotiques et le REP-PCR.

Les deux plages sélectionnées pour cette étude sont la plage Centre Island et la plage Kew Beach. Ces deux plages ont un niveau variable d'*E. coli* et elles ont dû être fermées à quelques reprises. Des échantillons ont été prélevés à différentes profondeurs pour ces deux plages pendant l'été 2004. Des échantillons de fèces d'animaux locaux (oiseaux, chiens, etc.) et d'une usine de traitement des eaux usées ont aussi été prélevés pour établir la banque de matériel microbien.

Suite à un dénombrement d'*E. coli*, les isolats provenant de sources connues et les isolats provenant des plages ont été incubés sur plaques contenant plusieurs antibiotiques pour faire le

profilage de résistance aux antibiotiques. En parallèle, l'ADN a été extrait des isolats et l'amplification de séquences répétitives (REP-PCR) a été effectuée pour obtenir une empreinte génétique des isolats.

Les deux méthodes ont identifié les oiseaux comme étant le groupe d'espèces qui avait le plus grand impact sur la qualité de l'eau. Cette étude a démontré une cohérence pour les résultats de deux méthodes de suivi de l'origine de la contamination.

#### **4. Conclusions**

À ce jour, il n'existe aucune méthode standardisée et globalement acceptée pour faire le suivi de l'origine de la contamination fécale. De plus, les méthodes de suivi de l'origine de la source de contamination n'ont pas été intégrées et acceptées par les agences gouvernementales. Il n'existe donc pas de normes quant au niveau de marqueurs génétiques acceptables pour l'utilisation de l'eau telles qu'elles existent pour *E. coli*. La plupart des méthodes recensées dans la littérature scientifique ont des avantages et des désavantages qui ont été décrits dans les sections précédentes. Pour faire un suivi efficace de la contamination, l'approche privilégiée dans la littérature est l'approche par «boîte à outils» qui consiste à utiliser plusieurs méthodes simultanément. Cette approche permettrait d'augmenter la sensibilité et la reproductibilité des résultats tout en évitant les faux positifs.

Généralement, dû à leurs nombreux avantages, les méthodes indépendantes de la culture et d'une banque de matériel microbien de référence ont remplacé les méthodes dépendantes de la culture et d'une banque de matériel microbien de référence. À notre connaissance, il n'existe pas d'étude publiée sur l'application des méthodes dépendantes de la culture et d'une banque de matériel microbien de référence au Québec. Les marqueurs génétiques ainsi que les marqueurs chimiques (méthodes indépendantes de la culture et d'une banque de matériel microbien de référence) ont été appliqués dans une quantité significative d'études effectuées au Québec, notamment l'ADN mitochondrial (Kortbaoui *et al.*, 2009, Martellini *et al.*, 2005, Villemur *et al.*, 2014), *Bacteroides* (Edge *et al.*, 2008, Villemur *et al.*, 2014) et la caféine ainsi que la carbamazépine (Guérineau *et al.*, 2014, Hajj-Mohamad *et al.*, 2014, Sauvé *et al.*, 2012). De plus, les marqueurs génétiques associés aux *Bacteroidales* ont été utilisés pour plusieurs études du bassin versant de la rivière South Nation en Ontario qui se déverse dans la rivière des

Outaouais (Frey *et al.*, 2015, Marti *et al.*, 2013, Marti *et al.*, 2011, Wilkes *et al.*, 2014). Ces marqueurs ont donc démontré leur applicabilité et leur utilité dans la détermination de l'origine de la contamination fécale pour le territoire (où à proximité) du Québec. Ces techniques pourraient être intégrées à l'approche actuelle de gestion des eaux au Québec, soit par bassin versant (MDDELCC, 2015).

## 5. Références

- 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 research* 47(18):6812-6828.
- Bouchet V, Huot H & Goldstein R (2008) Molecular Genetic Basis of Ribotyping. *Clinical Microbiology Reviews* 21(2):262-273.
- Cabral JP (2010) Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int J Environ Res Public Health* 7(10):3657-3703.
- 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.
- Cao Y, Griffith JF & Weisberg SB (2009) Evaluation of optical brightener photodecay characteristics for detection of human fecal contamination. *Water research* 43(8):2273-2279.
- Cao Y, Wu CH, Andersen GL & Holden PA (2011) Community Analysis-Based Methods (chapitre 11). *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.
- Carson CA, Shear BL, Ellersieck MR & Schnell JD (2003) Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal Escherichia coli from humans and animals. *Applied and environmental microbiology* 69(3):1836-1839.
- Casarez EA, Pillai SD & Di Giovanni GD (2007) Genotype diversity of Escherichia coli isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC-PCR. *Water research* 41(16):3643-3648.
- Cole D, Long SC & Sobsey MD (2003) Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Applied and environmental microbiology* 69(11):6507-6514.
- Daneshvar A, Aboufadi K, Viglino L, Broséus R, Sauvé S, Madoux-Humery A-S, Weyhenmeyer GA & Prévost M (2012) Evaluating pharmaceuticals and caffeine as indicators of fecal contamination in drinking water sources of the Greater Montreal region. *Chemosphere* 88(1):131-139.
- Derrien M, Jardé E, Gruau G, Pourcher AM, Gourmelon M, Jadas-Hécart A & Pierson Wickmann AC (2012) Origin of fecal contamination in waters from contrasted areas: Stanols as Microbial Source Tracking markers. *Water research* 46(13):4009-4016.

- Dick LK, Bernhard AE, Brodeur TJ, Santo Domingo JW, Simpson JM, Walters SP & Field KG (2005) Host distributions of uncultivated fecal Bacteroidales bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Applied and environmental microbiology* 71(6):3184-3191.
- Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST & Sadowsky MJ (2000) Use of repetitive DNA sequences and the PCR To differentiate Escherichia coli isolates from human and animal sources. *Applied and environmental microbiology* 66(6):2572-2577.
- Duran M, Haznedaroglu BZ & Zitomer DH (2006) Microbial source tracking using host specific FAME profiles of fecal coliforms. *Water research* 40(1):67-74.
- Ebdon J, Muniesa M & Taylor H (2007) The application of a recently isolated strain of Bacteroides (GB-124) to identify human sources of faecal pollution in a temperate river catchment. *Water research* 41(16):3683-3690.
- Ebdon J & Taylor HD (2006) Geographical stability of enterococcal antibiotic resistance profiles in Europe and its implications for the identification of fecal sources. *Environmental science & technology* 40(17):5327-5332.
- Edberg SC, Rice EW, Karlin RJ & Allen MJ (2000) Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Symposium series* 88(29):106S-116S.
- Edge TA & Hill S (2005) Occurrence of antibiotic resistance in Escherichia coli from surface waters and fecal pollution sources near Hamilton, Ontario. *Canadian journal of microbiology* 51(6):501-505.
- Edge TA, Hill S & Suen F (2008) An Investigation of the Sources of Fecal Contamination at Petrie Island Beach on the Ottawa River in 2007. Édité Institute NWROttawa).
- Edge, T., Hill, S., Stinson, G., Seto, P., & Marsalek, J. (2007). Experience with the antibiotic resistance analysis and DNA fingerprinting in tracking faecal pollution at two lake beaches. *Water Science & Technology*, 56(11), 51-58.
- Field KG & Samadpour M (2007) Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water research* 41(16):3517-3538.
- Fremaux, B., Boa, T., & Yost, C. K. (2010). Quantitative real-time PCR assays for sensitive detection of Canada goose-specific fecal pollution in water sources. *Applied and environmental microbiology*, 76(14), 4886-4889.
- Frey SK, Gottschall N, Wilkes G, Gregoire DS, Topp E, Pintar KD, Sunohara M, Marti R & Lapen DR (2015) Rainfall-induced runoff from exposed streambed sediments: an important source of water pollution. *Journal of environmental quality* 44(1):236-247.
- Frigon D, Biswal BK, Mazza A, Masson L & Gehr R (2013) Biological and physicochemical wastewater treatment processes reduce the prevalence of virulent Escherichia coli. *Applied and environmental microbiology* 79(3):835-844.
- Geldreich EE & Litsky W (1976) Fecal coliform and fecal streptococcus density relationships in waste discharges and receiving waters. *C R C Critical Reviews in Environmental Control* 6(4):349-369.
- Glassmeyer ST, Furlong ET, Kolpin DW, Cahill JD, Zaugg SD, Werner SL, Meyer MT & Kryak DD (2005) Transport of Chemical and Microbial Compounds from Known Wastewater Discharges: Potential for Use as Indicators of Human Fecal Contamination. *Environmental science & technology* 39(14):5157-5169.
- Graves AK, Hagedorn C, Teetor A, Mahal M, Booth AM & Reneau RB, Jr. (2002) Antibiotic resistance profiles to determine sources of fecal contamination in a rural Virginia watershed. *Journal of environmental quality* 31(4):1300-1308.

- Green HC, Dick LK, Gilpin B, Samadpour M & Field KG (2012) Genetic markers for rapid PCR-based identification of gull, Canada goose, duck, and chicken fecal contamination in water. *Applied and environmental microbiology* 78(2):503-510.
- Green HC, Haugland RA, Varma M, Millen HT, Borchardt MA, Field KG, Walters WA, Knight R, Sivaganesan M, Kelty CA & Shanks OC (2014) Improved HF183 quantitative real-time PCR assay for characterization of human fecal pollution in ambient surface water samples. *Applied and environmental microbiology* 80(10):3086-3094.
- Griffith JF, Weisberg SB & McGee CD (2003) Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples. *Journal of water and health* 1(4):141-151.
- 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.
- Haack SK, Garchow H, Klug MJ & Forney LJ (1995) Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Applied and environmental microbiology* 61(4):1458-1468.
- Hagedorn C, Crozier JB, Mentz KA, Booth AM, Graves AK, Nelson NJ & Reneau RB, Jr. (2003) Carbon source utilization profiles as a method to identify sources of faecal pollution in water. *J Appl Microbiol* 94(5):792-799.
- Hagedorn C & Weisberg SB (2011) Chemical-Based Fecal Source Tracking Methods (chapitre 8). *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.
- Hajj-Mohamad M, Aboufadi K, Darwano H, Madoux-Humery AS, Guerineau H, Sauve S, Prevost M & Dorner S (2014) Wastewater micropollutants as tracers of sewage contamination: analysis of combined sewer overflow and stream sediments. *Environmental science. Processes & impacts* 16(10):2442-2450.
- Harwood VJ, Boehm AB, Sassoubre LM, Vijayavel K, Stewart JR, Fong TT, Caprais MP, Converse RR, Diston D, Ebdon J, Fuhrman JA, Gourmelon M, Gentry-Shields J, Griffith JF, Kashian DR, Noble RT, Taylor H & Wicki M (2013) Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. *Water research* 47(18):6929-6943.
- Harwood VJ, Brownell M, Wang S, Lepo J, Ellender RD, Ajidahun A, Hellein KN, Kennedy E, Ye X & Flood C (2009) Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico. *Water research* 43(19):4812-4819.
- Harwood VJ & Stoeckel DM (2011) Performance Criteria (chapitre 2). *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.
- Harwood VJ, Whitlock J & Withington V (2000) Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. *Applied and environmental microbiology* 66(9):3698-3704.
- Harwood VJ, Wiggins B, Hagedorn C, Ellender RD, Gooch J, Kern J, Samadpour M, Chapman AC, Robinson BJ & Thompson BC (2003) Phenotypic library-based microbial source tracking methods: efficacy in the California collaborative study. *Journal of water and health* 1(4):153-166.
- Haugland RA, Varma M, Sivaganesan M, Kelty C, Peed L & Shanks OC (2010) Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of

- selected Bacteroidales species and human fecal waste by qPCR. *Systematic and applied microbiology* 33(6):348-357.
- 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.
- Hundesda A, Maluquer de Motes C, Albinana-Gimenez N, Rodriguez-Manzano J, Bofill-Mas S, Sunen E & Rosina Girones R (2009) Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J Virol Methods* 158(1-2):130-135.
- Johnston C, Byappanahalli MN, Gibson JM, Ufnar JA, Whitman RL & Stewart JR (2013) Probabilistic analysis showing that a combination of Bacteroides and Methanobrevibacter source tracking markers is effective for identifying waters contaminated by human fecal pollution. *Environmental science & technology* 47(23):13621-13628.
- Kildare BJ, Leutenegger CM, McSwain BS, Bambic DG, Rajal VB & Wuertz S (2007) 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: A Bayesian approach. *Water research* 41(16):3701-3715.
- 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 research* 43(7):2002-2010.
- Kühn I, Iversen A & Möllby R (2003) The PhenePlate™ system for studies of the diversity of enterococcal populations from the food chain and the environment. *International Journal of Food Microbiology* 88(2-3):189-196.
- Lavoie A (2006) Guide méthodologique pour la recherche et l'élimination des raccordements inversés dans les réseaux de collecte d'eaux usées municipales. Édité Affaires MD & Régions MEDQuébec).
- 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 research* 47(18):6897-6908.
- Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB & et al. (1994) A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *The New England journal of medicine* 331(3):161-167.
- Maluquer de Motes C, Clemente-Casares P, Hundesa A, Martín M & Girones R (2004) Detection of Bovine and Porcine Adenoviruses for Tracing the Source of Fecal Contamination. *Applied and environmental microbiology* 70(3):1448-1454.

- 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 research* 39(4):541-548.
- Marti R, Gannon VP, Jokinen C, Lanthier M, Lapen DR, Neumann NF, Ruecker NJ, Scott A, Wilkes G, Zhang Y & Topp E (2013) Quantitative multi-year elucidation of fecal sources of waterborne pathogen contamination in the South Nation River basin using bacteroidales microbial source tracking markers. *Water research* 47(7):2315-2324.
- Marti R, Zhang Y, Lapen DR & Topp E (2011) Development and validation of a microbial source tracking marker for the detection of fecal pollution by muskrats. *Journal of microbiological methods* 87(1):82-88.
- McFadden N (2006) Guide d'action pour l'élimination des raccordements inversés dans les réseaux de collecte d'eaux usées municipales. Édit Régions MDaMEDQuébec).
- McQuaig SM, Scott TM, Harwood VJ, Farrah SR & Lukasik JO (2006) Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. *Applied and environmental microbiology* 72(12):7567-7574.
- McQuaig SM, Scott TM, Lukasik JO, Paul JH & Harwood VJ (2009) Quantification of human polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. *Applied and environmental microbiology* 75(11):3379-3388.
- MDDEFP (2013) Étude d'impact économique du projet de règlement modifiant le règlement sur l'évacuation et le traitement des eaux usées des résidences isolées.).
- MDDELCC (2014a) *La qualité de l'eau et les usages récréatifs.*, (Consulté le 2014-12-27)
- MDDELCC (2014b) *La qualité de l'eau de mon puits.*, <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/EAU/potable/depliant/index.htm> (Consulté le 18 décembre)
- MDDELCC (2014c) Projet de stratégie de protection et de conservation des sources destinées à l'alimentation en eau potable.
- MDDELCC (2015) *La gestion intégrée de l'eau par bassin versant.*, <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/bassinversant/#gestion> (Consulté le 18 février)
- Meays CL, Broersma K, Nordin R & Mazumder A (2004) Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *Journal of Environmental Management* 73(1):71-79.
- Miller JM & Rhoden DL (1991) Preliminary evaluation of Biolog, a carbon source utilization method for bacterial identification. *Journal of Clinical Microbiology* 29(6):1143-1147.
- Mohapatra BR, Broersma K & Mazumder A (2007) Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS microbiology letters* 277(1):98-106.
- Mohapatra BR & Mazumder A (2008) Comparative efficacy of five different rep-PCR methods to discriminate *Escherichia coli* populations in aquatic environments. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 58(3):537-547.
- Moore DF, Harwood VJ, Ferguson DM, Lukasik J, Hannah P, Getrich M & Brownell M (2005) Evaluation of antibiotic resistance analysis and ribotyping for identification of faecal pollution sources in an urban watershed. *Journal of Applied Microbiology* 99(3):618-628.

- Moussa SH & Massengale RD (2008) Identification of the sources of *Escherichia coli* in a watershed using carbon-utilization patterns and composite data sets. *Journal of water and health* 6(2):197-207.
- Myoda SP, Carson CA, Fuhrmann JJ, Hahm BK, Hartel PG, Yampara-Lquise H, Johnson L, Kuntz RL, Nakatsu CH, Sadowsky MJ & Samadpour M (2003) Comparison of genotypic-based microbial source tracking methods requiring a host origin database. *Journal of water and health* 1(4):167-180.
- Nelson M, Jones SH, Edwards C & Ellis JC (2008) Characterization of *Escherichia coli* populations from gulls, landfill trash, and wastewater using ribotyping. *Diseases of aquatic organisms* 81(1):53-63.
- NPDES (2012) *National Pollutant Discharge Elimination System.*, [http://cfpub.epa.gov/npdes/home.cfm?program\\_id=5](http://cfpub.epa.gov/npdes/home.cfm?program_id=5)
- 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.
- Peeler KA, Opsahl SP & Chanton JP (2006) Tracking anthropogenic inputs using caffeine, indicator bacteria, and nutrients in rural freshwater and urban marine systems. *Environmental science & technology* 40(24):7616-7622.
- Price CS, Huynh H, Paule S, Hollis RJ, Noskin GA, Pfaller MA & Peterson LR (2002) Comparison of an Automated Ribotyping System to Restriction Endonuclease Analysis and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Differentiating Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 40(5):1858-1861.
- Ryu H, Griffith JF, Khan IU, Hill S, Edge TA, Toledo-Hernandez C, Gonzalez-Nieves J & Santo Domingo J (2012) Comparison of gull feces-specific assays targeting the 16S rRNA genes of *Catelicoccus marimammalium* and *Streptococcus* spp. *Applied and environmental microbiology* 78(6):1909-1916.
- Salyers AA (1984) Bacteroides of the human lower intestinal tract. *Annual review of microbiology* 38:293-313.
- Samadpour M, Roberts MC, Kitts C, Mulugeta W & Alfi D (2005) The use of ribotyping and antibiotic resistance patterns for identification of host sources of *Escherichia coli* strains. *Letters in applied microbiology* 40(1):63-68.
- Santé Canada (2012) Recommandations au sujet de la qualité des eaux utilisées à des fins récréatives au Canada.).
- Sauvé S, Aboufadel 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.
- Seurinck S, Deschepper E, Deboch B, Verstraete W & Siciliano S (2006) Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Different Fecal Sources by Means of Classification Tree Analysis of Fatty Acid Methyl Ester (Fame) Profiles. *Environ Monit Assess* 114(1-3):433-445.
- Shanks OC, Atikovic E, Blackwood AD, Lu J, Noble RT, Domingo JS, Seifring S, Sivaganesan M & Haugland RA (2008) Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution. *Applied and environmental microbiology* 74(3):745-752.
- 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.
- Sidhu JPS, Ahmed W, Gernjak W, Aryal R, McCarthy D, Palmer A, Kolotelo P & Toze S (2013) Sewage pollution in urban stormwater runoff as evident from the widespread presence

- of multiple microbial and chemical source tracking markers. *Science of The Total Environment* 463–464(0):488-496.
- Sinton LW, Finlay RK & Hannah DJ (1998) Distinguishing human from animal faecal contamination in water: A review. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 32(2):323-348.
- 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 research* 44(16):4674-4691.
- Solomon EB, Yaron S & Matthews KR (2002) Transmission of Escherichia coli O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and environmental microbiology* 68(1):397-400.
- Spilki FR, da Luz RB, Fabres RB, Soliman MC, Kluge M, Fleck JD, Rodrigues MT, Comerlato J, Cenci A, Cerva C, Dasso MG & Roehe PM (2013) Detection of human adenovirus, rotavirus and enterovirus in water samples collected on dairy farms from Tenente Portela, Northwest of Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(3):953-957.
- Stewart-Pullaro J, Daugomah JW, Chestnut DE, Graves DA, Sobsey MD & Scott GI (2006) F+ RNA coliphage typing for microbial source tracking in surface waters. *J Appl Microbiol* 101(5):1015-1026.
- Stoeckel DM & Harwood VJ (2007) Performance, Design, and Analysis in Microbial Source Tracking Studies. *Applied and environmental microbiology* 73(8):2405-2415.
- Straub TM & Chandler DP (2003) Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *Journal of microbiological methods* 53(2):185-197.
- Tambalo DD, Boa T, Liljebjelke K & Yost CK (2012) Evaluation of two quantitative PCR assays using Bacteroidales and mitochondrial DNA markers for tracking dog fecal contamination in waterbodies. *Journal of microbiological methods* 91(3):459-467.
- Ufnar JA, Wang SY, Christiansen JM, Yampara-Iquise H, Carson CA & Ellender RD (2006) Detection of the nifH gene of Methanobrevibacter smithii: a potential tool to identify sewage pollution in recreational waters. *J Appl Microbiol* 101(1):44-52.
- Ufnar JA, Wang SY, Ufnar DF & Ellender RD (2007) Methanobrevibacter ruminantium as an indicator of domesticated-ruminant fecal pollution in surface waters. *Applied and environmental microbiology* 73(21):7118-7121.
- Villemur R, Imbeau M, Vuong MN, Masson L & Payment P (2014) An environmental survey of surface waters using mitochondrial DNA from human, bovine and porcine origin as fecal source tracking markers. *Water research* 69c:143-153.
- Vuong NM, Villemur R, Payment P, Brousseau R, Topp E & Masson L (2013) Fecal source tracking in water using a mitochondrial DNA microarray. *Water research* 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.
- Wiggins BA, Cash PW, Creamer WS, Dart SE, Garcia PP, Gerecke TM, Han J, Henry BL, Hoover KB, Johnson EL, Jones KC, McCarthy JG, McDonough JA, Mercer SA, Noto MJ, Park H, Phillips MS, Purner SM, Smith BM, Stevens EN & Varner AK (2003) Use of Antibiotic Resistance Analysis for Representativeness Testing of Multiwatershed Libraries. *Applied and environmental microbiology* 69(6):3399-3405.
- Wilkes G, Brassard J, Edge TA, Gannon V, Gottschall N, Jokinen CC, Jones TH, Khan IUH, Marti R, Sunohara MD, Topp E & Lapen DR (2014) Long-Term Monitoring of Waterborne Pathogens and Microbial Source Tracking Markers in Paired Agricultural Watersheds

- under Controlled and Conventional Tile Drainage Management. *Applied and environmental microbiology* 80(12):3708-3720.
- Wolf S, Hewitt J & Greening GE (2010) Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Applied and environmental microbiology* 76(5):1388-1394.
- Wuertz S, Wang D, Reischer GH & Farnleitner AH (2011) Library-Independent Bacterial Source Tracking Methods (chapitre 4). *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.