

JEAN-LUC BERNIER

**TRANSFERT TECHNOLOGIQUE ET VALIDATION
DE TESTS MICROBIOLOGIQUES SUR UN
LABORATOIRE MOBILE CONÇU POUR LA
SURVEILLANCE DE LA QUALITÉ DE L'EAU EN
RÉGIONS ÉLOIGNÉES**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en microbiologie et immunologie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE MÉDICALE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2007

Résumé

L'eau est un vecteur important pour la transmission de maladies infectieuses. Les méthodes classiques utilisées pour évaluer la qualité microbiologique de l'eau sont cependant inaptes à garantir l'absence de tous les microorganismes pathogènes. Le développement de nouvelles méthodes moléculaires permettant la détection rapide, sensible, spécifique et abordable de ces microorganismes pourrait diminuer le nombre de cas d'infections reliées à la consommation d'eau potable.

Ce mémoire décrit la démarche empruntée pour adapter, utiliser et comparer des méthodes microbiologiques classiques à bord du laboratoire mobile Atlantis (LMA) lors d'une campagne de surveillance de la qualité l'eau en région éloignée. Nous élaborons ensuite sur le processus permettant le transfert technologique de deux méthodes moléculaires ciblant deux indicateurs de contamination fécale, *Escherichia coli* et les entérocoques. Les résultats de ces recherches permettent de conclure que le LMA pourra jouer un rôle prometteur pour la surveillance des maladies infectieuses d'origine hydrique.

Avant-Propos

Les résultats présentés dans ce mémoire ont été produits pour l'obtention du diplôme de maîtrise en science. Je voudrais remercier tous ceux et celles qui, de près ou de loin, m'ont supporté et m'ont aidé à réaliser ce projet.

Je tiens donc tout d'abord à remercier Dr Michel G. Bergeron, mon directeur de recherche pour m'avoir fait partager sa vision. Il m'a permis de découvrir un nouveau champ d'intérêt de recherche et m'a aidé à développer mes compétences dans le domaine. Je remercie également Susie Bernier, Coordonnatrice et Dr Éric Dewailly, Directeur et chercheur principal, tous deux du Centre *Nasivvik*, pour m'avoir fait confiance dès le début de ce projet. L'obstination de ces derniers pour la cause de la santé des Inuit et de l'environnement restera pour moi une source intarissable d'inspiration.

Je ne pourrais passer sous silence le travail acharné du Dr Maurice Boissinot, du Dr Luc Bissonnette, de ma collègue Andrée Maheux, du Dr François Picard ainsi que du Dr Daniel Martin sans qui ce travail n'aurait pu être accompli. Je remercie aussi tous mes collègues de travail pour leurs conseils et leur présence. Finalement, un merci spécial à mes parents, frères et amis pour leur support et à ma copine Geneviève pour ses encouragements.

Ce mémoire renferme un article qui sera soumis au «Water Quality Research Journal of Canada» pour lequel j'ai réalisé la quasi totalité des analyses ainsi que la majeure partie de la rédaction.

« La lucha sigue » Santiago Giroux

Table des matières

Résumé.....	ii
Avant-Propos	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations.....	ix
Introduction.....	1
Chapitre I	4
1.1 Revue de littérature.....	4
1.1.1 Épidémies d'origine hydrique.....	4
1.1.2 Les indicateurs de contamination fécale.....	9
1.1.2.1 Les microorganismes clés.....	10
1.1.2.2 Les méthodes classiques de détection.....	16
1.1.2.3 Limites des méthodes classiques de détection.....	22
1.2 Standards actuels de qualité microbiologique de l'eau de consommation.....	24
1.3 Technologies émergentes.....	27
1.3.1 Techniques immunologiques	27
1.3.2 Détection des acides nucléiques	27
1.4 Description du laboratoire mobile Atlantis.....	31
1.4.1 Le LMA en mission	32
1.5 Objectifs de recherche	34
1.5.1 Objectifs.....	34
1.5.1.1 Objectifs spécifiques.....	34
Chapitre II.....	35
<i>On-site Microbiological Quality Monitoring of Raw Drinking Water in Cree Community of Mistissini</i>	35
Résumé.....	35
Abstract.....	36
Chapitre III.....	66
Développement et transfert de méthodes de détection moléculaire	66
3.1 Introduction.....	66
3.1.1 Essais de détection moléculaire ciblant <i>E. coli</i> et les entérocoques	66
3.1.2 Problématique du transfert technologique	70
3.2 Protocoles utilisés et résultats obtenus.....	72
3.2.1 Optimisation du protocole d'amplification par PCR.....	72
3.2.1.1 Purification des produits d'amplification	72
3.2.1.2 Criblage de différentes combinaisons réactionelles pour l'amplification PCR.....	75
3.2.1.3 Optimisation de l'essai PCR utilisant les réactifs de NEB	78
3.2.1.4 Influence du nombre de cycle de PCR pour l'amplification sensible d'un produit WGA	80
3.2.1.5 Spécificité des essais indicateurs optimisés.....	83
3.2.1.6 Reproductibilité des méthodes moléculaires nouvellement optimisées et permettant la détection d' <i>E. coli</i> et des entérocoques.....	86

3.2.1.7 Adaptation de l'essai PCR ciblant <i>E. coli</i> en PCR en temps réel sur Smart Cycler.....	89
Chapitre IV	92
Discussion.....	92
Conclusion	96
Bibliographie	97

Liste des tableaux

Tableau 1 : Pathogènes microbiens transmissibles par consommation d'eau	8
Tableau 2 : Principaux microorganismes indicateurs et index d'intérêt en santé publique...	9
Tableau 3 : Évènements marquants de l'histoire de la recherche sur les indicateurs de contamination fécale	16
Tableau 4 : Normes émises par différentes juridiction en matière de qualité microbiologique de l'eau de consommation	26
Tableau 5 : Résultat général du thermocyclage permettant l'amplification spécifique d'une cible.....	28
Tableau 6 : <i>Microbiological analysis of fecal indicator microorganisms in environmental water used for drinking</i>	60
Tableau 7: <i>Survey of drinking water stored in portable containers</i>	61
Tableau 8: <i>Percentage of environmental sites samples contaminated according to U.S. Environmental Protection Agency (EPA) current drinking water standards</i> ...	62
Tableau 9: <i>Presence of total coliforms, Escherichia coli, and enterococci counts depending on environmental water source type and detection method</i>	63
Tableau 10 : Criblage comparatif de la performance de différents essais PCR dont les produits d'amplification peuvent être analysés sur le Bioanalyzer 2100 d'Agilent	76
Tableau 11 : Optimisation des concentrations de BSA et MgCl ₂ pour l'essai PCR avec l'enzyme <i>Taq</i> de NEB dans le tampon de NEB.....	79
Tableau 12 : Spécificité des essais PCR ciblant les indicateurs de contamination fécale	85
Tableau 13: Reproductibilité de la sensibilité fine des méthodes de détection moléculaire additionnées des essais WGA+PCR respectifs et nouvellement optimisés pour la détection de <i>E. coli</i> et des entérocoques	88

Liste des figures

Figure 1 : Illustration de l'organisation de la structure de l'ADN bactérien.....	28
Figure 2 : Composantes et principales étapes réactionnelles de l'amplification WGA utilisant la trousse GenomiPhi™ d'Amersham.....	30
Figure 3 : Le laboratoire mobile Atlantis sous sa tente au Bermudes	31
Figure 4 : Le MMCM à bord du brise-glace CCGS Amundsen lors de l'enquête de santé <i>Qanuippitaa?</i> en septembre 2005.	33
Figure 5: <i>Atlantis Mobile Laboratory ready to go and the interior design of its classic and molecular (CMM) module</i>	64
Figure 6: <i>Topology map of the Mistissini region showing the southern tip of Lake</i>	65
Figure 7 : Schéma organisationnel pour la réalisation des méthodes de détection de microbiologie classique et moléculaire.....	67
Figure 8 : Appareil Bioanalyzer 2100 d'Agilent ainsi que la puce électrophorétique à ADN servant à l'analyse de fragments d'ADN.....	71
Figure 9 : Analyse des produits d'amplification WGA-PCR par électrophorèse suite à la purification de l'ADN par précipitation à l'éthanol.....	74
Figure 10 : Sensibilité fine de l'essai d'amplification moléculaire par PCR et par WGA+PCR ciblant <i>E. coli</i> à 40 cycles d'amplification PCR	81
Figure 11 : Sensibilité fine de l'essai d'amplification moléculaire (WGA + PCR) ciblant <i>E. coli</i> à 35 ET 30 cycles d'amplification PCR.....	82
Figure 12: Sensibilité fine de la méthode de détection moléculaire additionnée de l'essai WGA+PCR nouvellement optimisé pour la détection de <i>E. coli</i> à partir de 100 mL d'eau	86
Figure 13: Sensibilité fine de la méthode de détection moléculaire additionnée de l'essai WGA+PCR nouvellement optimisé pour la détection des entérocoques à partir de 100 mL d'eau	87
Figure 14 : Sensibilité au cycle seuil de la version initiale de l'essai de détection ciblant <i>E. coli</i> adapté sur PCR en temps réel	90
Figure 15 : Température de fusion des produits d'amplification obtenus par l'essai PCR en temps réel ciblant <i>E. coli</i>	91

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
BHAA	Bactéries hétérotrophes aérobie et anaérobies facultatives
CRI	Centre de recherche en infectiologie
CT	Coliformes totaux
LMA	Laboratoire mobile Atlantis
MMCM	Module de microbiologie classique et moléculaire
NPP	Nombre le plus probable
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)
QC	Québec
RT-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne précédé d'une transcription inverse (<i>reverse-transcriptase polymerase chain reaction</i>)
TE	Tris-EDTA
UFC	unité formatrice de colonie
UNESCO	Organisation pour l'environnement, la société et la culture des Nations Unies (<i>United Nations Environment, Social and Cultural Organisation</i>)
US EPA	Agence de protection environnementale (<i>United States Environmental Protection Agency</i>)
VBNC	Viable mais non cultivable (<i>viable but nonculturable</i>)

Introduction

La démonstration par John Snow du lien entre une épidémie de choléra et la consommation d'eau provenant d'une fontaine publique de Londres (1854) est un fait marquant de l'histoire de la microbiologie de l'eau. Ses travaux ont souligné l'importance de la recherche et de l'approfondissement des connaissances portant sur la transmission des microorganismes pathogènes [1]. Malgré la quantité d'informations amassées jusqu'à présent sur les agents infectieux, la contamination microbienne de l'eau représente un important problème de santé publique à l'échelle mondiale [2]. L'OMS estime que plus de 1,4 milliards d'hommes n'ont pas accès à une eau potable de qualité et que les gastroentérites d'origine hydrique sont une cause importante de mortalité, étant responsables à elles seules d'environ 5 millions de décès par année [3]. La recherche et le développement de moyens efficaces et abordables pour évaluer la présence des pathogènes dans l'eau pourrait avoir un impact significatif sur la vie de milliards d'individus et représente donc un défi de taille que doit s'approprier l'humanité.

Ainsi, l'eau sert de vecteur de transmission pour de nombreux microorganismes pathogènes [4]. À l'heure actuelle, la surveillance systématique de tous les types de microorganismes pathogènes potentiellement retrouvés dans l'eau est difficile, laborieuse et très dispendieuse [5]. Elle ne s'effectue donc pas sur une base régulière. Comme la majorité de ces microorganismes pathogènes sont d'origine fécale, la surveillance routinière de la qualité microbiologique de l'eau potable se base sur la détection spécifique des microorganismes ubiquitaires de la flore intestinale animale. Ces microorganismes sont connus sous le nom d'indicateurs de contamination fécale. Malgré la simplicité avec laquelle ils peuvent être détectés, certaines études démontrent des faits non-favorables à leur adoption universelle en tant que cible unique pour assurer la qualité microbiologique de l'eau. Par exemple, ces microorganismes indicateurs sont très sensibles aux produits de désinfection et relativement fragiles dans l'environnement. Ils ne reflètent donc pas nécessairement la présence de tous les microorganismes, comme les virus et les larves enkystées des parasites, qui peuvent être plus résistants aux traitements habituellement utilisés pour rendre l'eau potable [6]. Les méthodes couramment utilisées pour détecter les indicateurs de contamination fécale utilisent en général des techniques de microbiologie classique qui

reposent sur la croissance sélective et différentielle des microorganismes. Ces méthodes présentent cependant de nombreuses faiblesses. On leur reproche notamment de ne pouvoir détecter les microorganismes endommagés ou viables mais non cultivables et de ne pas permettre la détection directe des pathogènes viraux et parasitaires [7].

À l'échelle internationale, il n'existe pas de normes précises acceptées concernant la qualité microbiologique de l'eau de consommation. De telles normes sont édictées par les gouvernements et varient conséquemment d'une juridiction à l'autre. Ces normes font cependant toutes appel aux méthodes se basant sur la détection par la croissance des microorganismes indicateurs de contamination fécale.

Depuis la découverte de la structure de l'ADN, le développement de la biologie moléculaire a permis l'élaboration de méthodes qui ont facilité l'identification des microorganismes. Ainsi, au cours des 20 dernières années, des outils de biologie moléculaire ont pu être mis au point afin de permettre la détection directe des microorganismes indicateurs [7]. En comparaison aux méthodes classiques, les méthodes moléculaires permettent une détection plus rapide [8]. Ces dernières offrent aussi la possibilité de détecter directement les microorganismes pathogènes qui peuvent être viables ou encore inactifs et ce, à partir d'un échantillon d'eau [7, 9, 10]. Le développement de telles méthodes permettrait potentiellement d'offrir aux autorités de santé publique des outils de détection plus performants afin de diminuer le nombre de cas de maladies et de décès reliés à la consommation d'eau contaminée.

Certaines régions éloignées du Québec sont aux prises avec des problèmes d'accès à l'eau potable. En raison des habitudes traditionnelles, les peuples autochtones établis dans ces régions du Québec ont recours à des sources d'approvisionnement en eau non contrôlées puisque l'eau traitée et distribuée dans les communautés a parfois un goût de chlore et qu'une telle eau ne produit pas un thé de qualité [11]. Il a cependant été observé que les enfants de ces populations (0-14 ans) étaient plus susceptibles de développer des maladies d'origine hydrique telles des shigelloses, des hépatites et des lamblases ou giardiasis comparativement aux enfants du reste du Canada [12].

Devant la menace que représentent les maladies d'origine hydrique pour toutes les populations de nos sociétés, le présent projet de recherche vise à évaluer la capacité du laboratoire mobile Atlantis à permettre le déroulement d'une campagne de surveillance de

la qualité microbiologique des eaux en régions éloignées ainsi que le transfert technologique de méthodes de détection moléculaires.

Chapitre I

1.1 Revue de littérature

1.1.1 Épidémies d'origine hydrique

Une épidémie (du grec *epi* = sur et *demos* = peuple) est définie comme étant l'augmentation et la propagation inhabituellement rapides, dans une collectivité ou un territoire donné et pendant une période de temps limitée, du nombre de cas d'une maladie transmissible [13]. Il est maintenant évident que l'eau constitue un important vecteur de transmission des microorganismes pathogènes responsables d'épidémies [4]. Tel qu'illustré dans le tableau 1, les pathogènes se transmettant par l'eau peuvent être des virus, des bactéries et des parasites. Divers événements d'éclosions microbiennes ont marqués l'histoire de la santé publique et de la microbiologie de l'eau, en particulier, celles de deux bactéries, *Vibrio cholerae* et *Salmonella enterica* serovar Typhi.

V. cholerae, agent étiologique du choléra, est responsable de plusieurs épidémies d'origine hydrique à l'échelle mondiale. Les premières éclosions ont été recensées en Asie et plus particulièrement en Inde [14]. La maladie se serait ensuite rapidement répandue en Russie et en Europe avant de rejoindre le continent américain, frappant d'abord les agglomérations urbaines denses. Les londoniens ont été victimes, entre les années 1832 et 1866, de 4 épidémies de choléra entraînant la perte de plusieurs dizaines de milliers de vies humaines [15].

L'origine épidémiologique de *S. typhi*, agent causal de la typhoïde, est moins bien documentée. En 1840, un anglais du nom de William Budd tente en vain de persuader les autorités de santé publique européenne que la typhoïde se transmet par l'eau. Cependant, alors qu'à cette époque la fièvre typhoïde tue une personne sur 200, le gouvernement anglais n'imposa la filtration de l'eau dans les aqueducs qu'en 1852. Dix ans après cette réforme, le nombre de gens mourant de cette maladie chute de moitié [16]. Ce n'est qu'en 1919 que des chercheurs reconnaissent officiellement le rôle de l'eau de consommation dans la transmission de *S. typhi* [17]. Au début du 20^{ème} siècle, les grandes villes

européennes et états-uniennes s'équipent de systèmes de traitement d'eau comprenant des filtres et des appareils de chloration ce qui permet l'éradication de la typhoïde [18].

Dès 1875, les médecins suédois ont commencé à archiver méticuleusement leurs observations épidémiologiques [19]. Deux éclosions majeures de choléra dues à la consommation d'eau sont datées de 1834 et 1874, coïncidant avec les épidémies de Londres. Entre 1880 et 1979, on dénombra en Suède 77 épidémies dues à la consommation d'eau, comptant 26 867 cas de maladies ainsi que 789 morts [19]. Les agents étiologiques responsables de ces épidémies sont cependant inconnus dans 88% des cas. Entre 1980 et 1999, ce chiffre n'a diminué qu'à 70% [19]. Parmi le 30% de causes connues, on détecte en Suède principalement *Campylobacter* sp. et *Giardia duodenalis*. On y dénombre aussi quelques cas dus aux *Shigella* sp., à *Entamoeba histolytica*, à *Escherichia coli* entérotoxigène ainsi qu'aux *Cryptosporidium* sp. [19].

Différents sérotypes d'*Escherichia coli* ont été impliqués dans des épidémies d'origine hydrique [20]. *E. coli* entérotoxigène est reconnu seulement comme pathogène entérique depuis une épidémie en Oregon, aux États-Unis, en 1975 [21]. Ce sérotype a depuis été retrouvé dans plusieurs cas d'épidémies mineures [20]. Il s'agit en fait de la cause première d'épidémie de gastroentérites d'origine bactérienne sur les bateaux de croisières [22]. *E. coli* entéroinvasif est aussi impliqué dans des épidémies d'origine hydrique quoique moins fréquemment que les autres sérotypes. *E. coli* entérotoxigène de sérotype O157:H7 a pour sa part été identifié pour la première fois comme pathogène en 1982. Il était alors responsable d'une épidémie de colites hémorragiques [23]. Entre les années 1982 et 2002, cette bactérie a causé 31 épidémies d'origine hydrique dont 10 impliquant la consommation d'eau contaminée. Ces épidémies étaient principalement dues à l'absence ou la défaillance de système de chloration des voies d'eau publique [24].

En décembre 1955 et janvier 1956 à Delhi, en Inde, plus de 230 000 cas d'hépatites se sont déclarés suite à la consommation d'eau de la rivière Jumna. Six semaines auparavant, des égouts se seraient déversés dans l'eau durant une semaine complète. L'ajout de fortes doses d'alun et de chlore à l'eau aurait permis d'inhiber les éclosions bactériennes mais n'aurait pas été suffisant pour éradiquer les virus de l'hépatite [25]. Des années plus tard, le virus de l'hépatite E est identifié comme l'agent étiologique ayant causé cette épidémie.

Depuis, on observe des épidémies d'origine hydrique dues au virus de l'hépatite A, au norovirus, au rotavirus, à l'adénovirus, à l'astrovirus ainsi qu'au virus de l'hépatite E, de manière récurrente et particulièrement dans les régions pauvres du globe comme l'Inde, la province chinoise de Xinjian, l'Asie centrale et les pays de l'ex-URSS.

Au Canada, des études récentes ont démontrées que 14 à 40% des gastroentérites sont reliées à la consommation d'eau publique traitée qui atteint les standards canadiens de qualité microbiologique. Selon les auteurs, ces maladies sont causées en grande partie par des virus qui ne sont pas affectés par les nombreuses étapes de purification utilisées au Canada comme la chloration, l'ozonation et la filtration [6].

Chaque année encore, des épidémies d'origine hydrique dues à des microorganismes pathogènes ont lieu en Amérique du Nord et en Europe de l'Ouest, alors que ces régions du globe possèdent les plus grandes économies et ont accès à toutes les technologies en matière de traitement de l'eau [26]. Dans les 15 dernières années, deux évènements majeurs de contamination de l'eau ont marqué l'histoire de la santé publique américaine. En 1993, 403 000 habitants de Milwaukee au Wisconsin ont été malades (1/4 de la population de Milwaukee) et 4000 ont été hospitalisés suite à une défaillance du système de filtration dans une des deux installations d'approvisionnement et de traitement d'eau potable. Cette défaillance empêcha la rétention de *Cryptosporidium* hors des voies d'eau publique. Il est estimé que les coûts engendrés par un tel évènement se chiffrent à 96,2 millions de dollars US [27]. Plus récemment, en mai 2000, *Escherichia coli* 0157:H7 et *Campylobacter jejuni* ont été co-identifiés dans des fèces de patients lors de la plus grande épidémie des cinq dernières années au Canada, celle de Walkerton en Ontario [28]. Durant cette épidémie, plus de 2300 personnes sur les 4800 habitants la ville de Walkerton ont développé une gastroentérite, 65 ont été hospitalités, 27 ont développé des syndromes hémolytiques et urémiques (causant des insuffisances rénales aiguës) et 7 sont décédés. Les microorganismes pathogènes auraient été transportés dans l'eau de consommation suite à la contamination d'un puits peu profond (5-8 mètres) par des matières fécales bovines provenant de champs environnants lors d'un épisode de fortes pluies. D'après le rapport de la Commission O'Connor chargée de l'investigation des causes de l'épidémie de Walkerton, il semblerait qu'une gestion inappropriée du système de chloration et un manque de

rigueur de la part des opérateurs quand à la prise de données de chlore résiduel et des contrôles de qualité microbiologique aient été responsables de ces éclosions bactériennes [28]. Il est de notre avis cependant que les indicateurs de contamination fécale ainsi que les techniques utilisées pour évaluer le risque associé à la consommation de l'eau contaminée ne sont pas en mesure de révéler la présence des microorganismes pathogènes ayant causé cette épidémie.

Tableau 1 : Microorganismes pathogènes transmissibles par consommation d'eau (Source : [29], [30] et [31])

Microorganismes	Maladies	Symptômes cliniques	Persistance dans l'eau	Résistance au chlore
Virus				
Hépatite A	Hépatite virale	Hépatite	> 1 mois	modérée
Virus de l'Hépatite E	Hépatite virale	Hépatite	> 1 mois	modérée
Norovirus et Sapovirus	Gastroentérite	Diarrhées, vomissement	> 1 mois	modérée
Entérovirus	Variés dont poliomyélite	Variées	> 1 mois	modérée
Adénovirus (sérotpe 40-41)	Gastroentérites		> 1 mois	modérée
Autres virus entériques				
Bactéries				
<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra	Large spectre de diarrhées	> 1 mois	faible
<i>Salmonella</i> spp.	Salmonellose	Diarrhées et fièvre	> 1 mois	faible
<i>Salmonella typhi</i>	Fièvre typhoïde	Fièvre, douleur abdominale et mortalité	> 1 mois	faible
<i>Shigella</i> spp.	Shigellose (dysenterie bacillaire)	Diarrhées avec perte de sang	> 1 mois	faible
<i>Campylobacter</i> spp.	Campylobactériose et fièvre de Pontiac	Diarrhées avec perte de sang	> 1 mois	faible
<i>Legionella</i>	Légionellose	Diarrhées liquide	> 1 mois	faible
<i>E. coli</i> enterotoxigène		Diarrhées avec perte de sang	> 1 mois	faible
<i>E. coli</i> entérohaémorragique		Fièvre, diarrhées et douleur abdominale	> 1 mois	faible
<i>Yersinia</i> spp.	Yersiniose	Lésions purulentes ou mucocutannées avec symptômes de typhoïde	> 1 mois	faible
<i>Francisella tularensis</i>	Tularémie	Lésions multiples (respiratoire, peau, etc.)	Non-établi	Non-établi
<i>Helicobacter pylori</i>	Variés		Non-établi	Non-établi
<i>Mycobacteria</i> spp. (sauf <i>M. tuberculosis</i>)	Cancer gastrique		Possibilité de multiplication	élevée
Parasites				
<i>Schistosoma</i> spp.	Schistosomiase	Infection urinaire, cancer de la vessie	> 1 mois	modérée
<i>Dracunculus medinensis</i>	Dracunculiasis	Ulcères	> 1 mois	modérée
<i>Giardia duodenalis</i>	Giardiase	Diarrhées et douleurs abdominales	> 1 mois	élevée
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cryptosporidiose	Diarrhées prolongées	> 1 mois	élevée
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Cyclosporiase	Diarrhées et douleurs abdominales	> 1 mois	élevée
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amibiase	Diarrhées	> 1 mois	élevée
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmose	Fièvre glandulaire, mortalité du fœtus	> 1 mois	élevée

1.1.2 Les indicateurs de contamination fécale

Depuis l'époque des grandes épidémies de choléra, l'eau potable est sujette à des campagnes et des programmes de surveillance afin de protéger la santé publique des risques associés à la présence de microorganismes pathogènes. La détection systématique de tous ces pathogènes est cependant hors d'atteinte du domaine de la surveillance publique. Ces microorganismes sont habituellement retrouvés en faible concentration dans l'environnement ce qui rend laborieux leur détection et leur identification. De plus, les technologies disponibles pour leur détection sont trop coûteuses pour être utilisées de façon routinière. Sachant que les microorganismes pathogènes transmis par l'eau sont en grande majorité d'origine fécale, les méthodes d'évaluation de la qualité microbiologique de l'eau potable ont depuis le début été conçues pour détecter des microorganismes qui révéleraient la présence de matières fécales dans l'eau. Ces microorganismes sont nommés les indicateurs de contamination fécale. Tel qu'illustré au tableau 2, l'OMS fait dorénavant la distinction entre trois groupes de microorganismes indicateurs.

Tableau 2 : Principaux microorganismes indicateurs et index d'intérêt en santé publique (voir section 1.1.2.1 pour la définition des groupes de microorganismes; traduit de [32])

Group	Définition	Exemple
Indicateurs de procédé	Un groupe d'organismes qui démontrent l'efficacité d'un procédé de traitement	Les bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives ou les coliformes totaux pour la désinfection au chlore
Indicateurs fécaux	Un groupe d'organismes qui indiquent la présence de contamination fécale	Les coliformes thermotolérants ou les <i>Escherichia coli</i> suggèrent, tout au plus, la présence de microorganismes pathogènes
Microorganismes index	Un groupe d'organismes qui indiquent la présence et l'état d'organismes pathogènes	<i>Escherichia coli</i> comme index des <i>Salmonella</i> et les coliphages comme index des virus entériques humains

1.1.2.1 Les microorganismes clés

De nombreux microorganismes ou groupe de microorganismes sont retrouvés dans la matière fécale mais seules quelques espèces ont le potentiel de servir d'indicateur. Les caractéristiques de l'indicateur idéal ont été décrit il y a quarante ans par Bonde [33] et améliorés plus tard par Toranzos et McFeters [7]. Ces derniers stipulent que l'indicateur de contamination fécale idéal doit être:

- 1 Uniquement associé à la présence d'organismes pathogènes;
- 2 Absent naturellement dans l'environnement;
- 3 Autant résistant à l'environnement (transport et survie) et à la désinfection que les autres microorganismes pathogènes;
- 4 Facilement isolable (cultivable) et identifiable;
- 5 Ne doit pas se multiplier dans l'environnement;
- 6 Doit pouvoir être détecté par des tests simples et robustes;
- 7 Présent en quantité proportionnelle au degré de contamination, à la concentration de microorganismes pathogènes et de risque sur la santé.

L'attribut le plus important est sans doute la corrélation quantitative entre la concentration de l'indicateur et le degré de risque encouru par la santé publique. Deux méthodes prévalent quand vient le temps d'évaluer cette relation, les études épidémiologiques d'exposition récréatives [34-37] et l'évaluation de la corrélation entre la concentration des indicateurs et de différents microorganismes pathogènes [7, 38-40]. L'agence états-unienne US EPA privilégie la première de ces méthodes. La seconde est utilisée moins fréquemment étant donné que la détection spécifique d'un organisme pathogène dans un échantillon ne permet pas d'assurer la présence d'autres pathogènes ni leurs effets respectifs sur la santé humaine. Certaines études démontrent cependant que de telles corrélations peuvent être assez robustes, tel les coliphages F+ comme index des entérovirus dans des eaux environnementales, démontré en Hollande [41].

Trois autres attributs importants sont les doses minimales infectantes, les corrélations de survie et de transport entre l'indicateur évalué et les pathogènes d'intérêt [42]. La dose

minimale infectante (DMI) pour *Escherichia coli* se chiffre entre 1 million et 100 million unités formatrices de colonie (UFC), alors que celle pour *E. coli* O157:H7 est de moins de 100 et celle de *Campylobacter jejuni* est d'environ 500 UFC. En ce qui a trait aux protozoaires, *Giardia lamblia* présente une DMI de 10 à 100 cystes et *Cryptosporidium* en présente une d'environ 10 oocystes. Quand à lui, le virus de l'Hépatite A a une DMI de 1 à 10 unités formatrices de plaque (pfu) [43]. Contrairement aux indicateurs bactériens, les virus peuvent se rendre dans les sources souterraines et ainsi contaminer les nappes phréatiques [44]. Aussi, l'indicateur *Clostridium perfringens* forme des spores qui résistent longtemps dans l'environnement, plus longtemps que les virus et les parasites pathogènes, faussant ainsi le degré de risque associé à la consommation de l'eau analysée [32]. D'autre part, les paramètres abiotiques et biotiques influençant la survie des microorganismes indicateurs et pathogènes sont nombreux [45]: les rayons UV [46], la température [47], la salinité [48], la prédation par la flore autochtone et surtout par les protozoaires [49], la dessiccation [50] ainsi que la capacité de ces microorganismes à sporuler, s'enkyster, atteindre un état viable mais non cultivable (VBNC) ou à résister aux produits de désinfection.

Un autre attribut important est la relation de représentation quantitative entre l'indicateur et les pathogènes d'intérêt [51]. L'indicateur idéal doit finalement être spécifique à la source d'où proviennent les pathogènes, dans ce cas-ci des fèces animales [32].

1.1.2.1.1 Bactéries hétérotrophes aérobie et anaérobies facultatives

Les méthodes de détection des bactéries hétérotrophes aérobie et anaérobies facultatives (BHAA) visent à estimer la population bactérienne générale dans l'eau potable. Ce regroupement de microorganismes possède un large spectre de capacités métaboliques et de besoins de croissance mais ne constituent probablement pas de risque réel sur la santé [6]. Le microbiologiste allemand Robert Koch en 1893, proposa le paramètre de 100 UFC de BHAA / mL afin d'évaluer la qualité microbiologique de l'eau [6]. Ses observations épidémiologiques lui avaient permis d'établir un lien entre les événements de maladies d'origine hydrique et le taux élevé de BHAA. Le compte de BHAA devint rapidement et reste aujourd'hui un des standards d'évaluation de la qualité microbiologique de l'eau [6,

52, 53]. Il n'existe incidemment pas de méthodes universelles pour la détection des BHAA. De nombreux milieux de culture sont aujourd'hui disponibles, les températures d'incubation variant de 20°C à 37°C et les périodes d'incubation de quelques heures à au-delà de 7 jours [31]. Les méthodes utilisant l'incubation sur gélose pendant 48h à 35°C semblent cependant les plus propices à la croissance des bactéries potentiellement pathogènes [6]. L'utilité des décomptes des BHAA pour l'étude ci-présente réside dans leur capacité à endommager et à réduire la population de coliformes détectée par les méthodes classiques ce qui causerait une sous-estimation de la contamination fécale et potentiellement de la présence de pathogènes.

1.1.2.1.2 Coliformes totaux

Le terme coliforme est utilisé depuis longtemps par les bactériologistes pour désigner un groupe de bactéries qui peuvent être employées comme indicateurs de contamination fécale [29, 54]. Ce groupe d'indicateur a cependant été employé en remplacement d'*E. coli*, de là le nom *coli-form*, pour évaluer la présence de contamination fécale [55]. Ceci est dû à trois raisons principales: 1) les coliformes totaux sont facilement isolables des fèces humaines et de l'eau contaminée par la matière fécale ; 2) la plupart (50-100%) des coliformes totaux isolés de la matière fécale sont des *E. coli* [56, 57] et il était donc admis que la détection des coliformes totaux reflétait la présence d'*E. coli* ; et 3) que les technologies disponibles au début du 20^{ème} siècle ne permettaient pas la discrimination des *E. coli* avec les autres coliformes totaux sur une base routinière [55]. Ce groupe de bactéries est aujourd'hui défini par l'OMS comme étant des bâtonnets à gram négatif, positifs pour la catalase et négatifs pour l'oxydase, capable de croître en présence de sels biliaries et de fermenter le lactose à 35-37°C en produisant de l'acide, du gaz et de l'aldéhyde en 24-48 heures [31]. Aussi compris dans ce groupe sont les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* qui sont positifs pour la β -galactosidase. Plusieurs coliformes, telles que celles appartenant aux genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Morganella* et *Proteus*, sont non pathogènes pour la grande majorité et font partie de la flore normale du tractus gastro-intestinal, alors que d'autres sont des pathogènes opportunistes, telles les espèces du genre *Salmonella*, *Shigella*, l'espèce *Yersinia pestis*, ainsi que les sérotypes entérotoxigènes, entéroinvasifs et entéro-pathogènes de type O157:H7 d'*E. coli*.

Plusieurs études démontrent la présence de coliformes totaux dans des échantillons environnementaux composés de matières provenant de plantes, d'insectes, de l'eau et du sol [29]. Les coliformes totaux sont aujourd'hui utilisés comme indicateur de procédé des systèmes de traitement de l'eau et de moins en moins en tant qu'indicateur de contamination fécale. Ils permettent aussi d'indiquer la présence potentielle de biofilms. Les BHAA sont cependant considérés comme de meilleurs indicateurs pour ces deux utilisations [31]. Selon des données recueillies durant les 20 dernières années, les coliformes thermotolérants, l'*E. coli* et les entérocoques sont des indicateurs de contamination fécale plus valides que les coliformes totaux [37, 55].

1.1.2.1.3 Coliformes thermotolérants

Les bactéries formant ce sous-groupe des coliformes totaux se distinguent de ces dernières par leur capacité à fermenter le lactose et à produire du gaz et de l'acide à des températures de $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ en 24 ± 2 heures. On croyait d'abord que les bactéries ayant la capacité de croître à des températures élevées étaient nécessairement d'origine fécale, on les appelait donc les coliformes fécaux. De nombreuses études ont par la suite démontrées que certains de ces coliformes thermotolérants (CT) étaient retrouvés dans l'environnement en absence de contamination fécale [58, 59]. On remplaça donc le terme « coliformes fécaux » par « coliformes thermotolérants » [29]. Ce dernier sera d'ailleurs privilégié dans ce mémoire, malgré que le terme de microbiologie le plus adéquat pour désigner ce groupe d'indicateurs est « coliformes thermotrophes » [29]. Les CT forment le groupe de microorganismes le plus communément utilisé en tant qu'indicateur de contamination fécale et ce malgré que certains de ses membres soient parfois retrouvés dans l'environnement [29].

Escherichia coli représente 94% des CT alors que les autres espèces, telles les *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Citrobacter* ne représentent que 3.2 à 7.4% [17]. *E. coli* se distinguent des autres CT par sa capacité à produire de l'indole à partir du tryptophane et aussi par son activité β -glucuronidase. Cette espèce bactérienne est considérée comme le meilleur indicateur de contamination fécale [26]. Ceci est principalement dû à sa faible prévalence dans l'environnement comparativement à celles des autres CT. En effet, *Escherichia coli* est rarement présent en absence de contamination fécale, quoique l'on en a retrouvé dans

les écosystèmes tropicaux et subtropicaux [60-63], tempéré [48, 64, 65], ainsi que dans des écosystèmes spécifiques fermés comme dans la sarracénie pourpre, une plante herbacée carnivore et emblème floral de la province de Terre-Neuve [66]. Les méthodes classiques de détection d'*E. coli* sont relativement simples à réaliser, sensibles et abordables. *E. coli* n'est cependant pas considéré comme un index de la présence de pathogènes entériques viraux ou parasitaires. Cette bactérie est sensible aux produits de désinfection et survit relativement mal dans l'environnement comparativement aux pathogènes susmentionnés [67]. Il est généralement admis que de plus amples recherches devraient porter sur la corrélation de la présence d'*E. coli* avec celle des pathogènes afin de déterminer la nécessité de développer de nouveaux indicateurs et que la détection des pathogènes viraux et parasitaires nécessite une analyse directe et indépendante.

1.1.2.1.4 Les entérocoques intestinaux

Les bactéries regroupées sous l'appellation générale des « streptocoques fécaux » sont des coques à Gram-positif et sont négatifs pour la catalase. De plus, ils hydrolysent l'esculine, ne sont pas inhibés par les sels biliaires et tolèrent les environnements au pH basique. Ils sont anaérobies facultatifs et croissent seuls, en paires ou en chaînettes. Ils appartiennent aux genres *Enterococcus* et *Streptococcus* et possèdent l'antigène groupe D de Lancefield [32, 68]. Les entérocoques de la flore intestinale peuvent être discriminés des streptocoques fécaux par leur capacité à croître à 10°C et à 45°C, à pH 9.6 et dans un milieu contenant 6,5% NaCl. Ces bactéries ont d'ailleurs commencé à être utilisées comme indicateur de contamination fécale de l'eau de mer aux États-Unis dans les années 1940-1950 [69, 70]. Quoique certaines études démontrent la présence des entérocoques intestinaux dans le sol et dans l'eau en absence de contamination fécale, ce groupe est considéré comme ayant une grande spécificité pour la contamination fécale. Les entérocoques intestinaux sont cependant retrouvés en plus faible quantité dans la matière fécale que les *E. coli* [29]. Une caractéristique avantageuse des entérocoques intestinaux réside dans leur capacité de survie dans l'eau [71], leur résistance à la dessiccation, au pH élevé, à la chloration [6, 42] et au traitement de l'eau en aérobie [72] comparativement aux *E. coli*. Selon l'OMS, ils servent à compléter la détection des *E. coli* [31].

1.1.2.1.5 *Clostridium perfringens* et autres *Clostridium* sulphito-réducteur

Ces bactéries sont des anaérobies strictes qui réduisent les sulfites (SO₄⁻) en hydroxyde de soufre (H₂S). Elles sont à Gram positif, sporulées, non-motiles, en forme de bâtonnet et ont d'abord été rapportées par Welch et Nutall en 1892 comme agent causal de la gangrène. Ces microorganismes sont utilisés principalement en Europe pour évaluer la qualité microbiologique de l'eau potable [32, 33]. Ils sont exceptionnellement résistants aux conditions environnementales défavorables telles les radiations UV, des valeurs de pH et de températures extrêmes et la présence d'agents de désinfection. Ils sont ainsi considérés comme étant les meilleurs indicateurs de la présence des pathogènes entériques viraux et parasitaires, qui survivent plus longtemps dans l'environnement que les indicateurs bactériens de type coliforme [6, 73]. Cette grande résistance du *C. perfringens* dans l'environnement dépasse cependant celle des pathogènes viraux et parasitaires et fausse potentiellement la perception quand à la qualité microbiologique réelle de l'eau testée [74]. Tout comme la plupart des *E. coli* et des entérocoques intestinaux, *C. perfringens* ne se multiplie normalement pas dans l'environnement tempéré. La complexité et le coût élevé des méthodes de détection sont les principaux inconvénients de l'utilisation de ce groupe d'indicateur [74].

1.1.2.1.6 Les coliphages

Les coliphages sont des bactériophages qui infectent spécifiquement *E. coli* ainsi que d'autres espèces apparentées (*Shigella* sp.) et qui les utilisent comme hôte afin de se répliquer. Ils sont ainsi assez spécifiques aux *E. coli* et se répliquent donc dans les fèces humaines ou animales mais aussi dans l'environnement dans la mesure obligatoire où les hôtes bactériens y sont présents. On dénombre deux groupes de coliphages utilisés comme indicateur de contamination fécale : les coliphages somatiques et les coliphages F-ARN. La grande différence entre ces deux groupes est leur voie d'infection.

Les coliphages F-ARN sont potentiellement de bons indicateurs de contamination fécale virale étant donné leur similarité de comportement, de morphologie et de structure avec les virus entériques humains [75]. La similarité entre les capacités de survie dans l'eau des coliphages et des virus entériques a d'ailleurs été démontrée [41]. De plus, les coliphages

sont résistants aux désinfectants utilisés pour le traitement de l'eau tel que le chlore [32, 76-79]. Par contre, ils ne satisfont pas tous les critères correspondant à l'organisme indicateur absolu [32]. En effet, Grabow *et al* en 2000 ont détecté des virus entériques à partir d'échantillons d'eau qui étaient négatifs pour les coliphages [32].

1.1.2.2 Les méthodes classiques de détection

Comme en fait foi le tableau 3, le développement des technologies de détection et l'approfondissement des connaissances sur la biologie des indicateurs de contamination fécale ont évolué de pair. La définition d'un indicateur est ainsi intimement liée à la méthode permettant sa détection. Les microorganismes qui ont suscité le plus d'intérêt parmi les indicateurs décrit ci-haut, sont indubitablement les coliformes totaux. L'importance de ces indicateurs est en grande partie due à la relative simplicité des protocoles permettant leur détection ainsi qu'à l'évolution assez rapide des techniques impliqués dans ces protocoles de détection.

Tableau 3 : Évènements marquants de l'histoire de la recherche sur les indicateurs de contamination fécale (source : [17, 26, 29, 32])

Année	Évènements
1854	John Snow associe une épidémie de choléra à la fontaine à eau de <i>Broad Street</i>
1881	Robert Koch démontre l'effet bactéricide des hypochlorites sur des cultures de bactéries
1882	Friedländer observe le premier coliforme (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)
1885	Robert Koch isole la bactérie <i>Vibrio cholerae</i> de la rivière Elbe en territoire allemand
	Utilisation par Frankland de milieu en gélatine pour effectuer les premières observations de routine de l'eau de distribution publique à Londres
1890	Theodor Escherich découvre le célèbre <i>Bacillus coli</i>
	Koch publie son manifeste <i>Germ theory of disease</i> qui expose le lien entre l'épidémie du choléra et l'éclosion de <i>V. cholerae</i> dans l'eau
1891	Percy et Grace Frankland décrivent le concept d'indicateur en se basant sur la présomption que les fèces des gens malades contiennent des pathogènes. Ils

-
- concluent que les organismes retrouvés dans les égouts doivent être la cible de plus amples recherches afin de mieux évaluer le risque associé à la consommation d'eau
- 1892 Schardinger suggère l'utilisation de *B. coli* comme indicateur pour la surveillance de la qualité de l'eau en Australie
- 1893 Blachstein décrit les coliformes
Première utilisation de l'ozone comme désinfectant de l'eau (Hollande)
- 1895 Smith introduit l'utilisation de *B. coli* comme indicateur pour la surveillance de la qualité de l'eau en Australie
- 1904 Eijkman découvre la thermotolérance de *B. coli* (45°C)
- 1905 MacConkey élabore le milieu permettant de sélectionner les coliformes selon leur habileté à fermenter le lactose en produisant de l'acide
- 1907 Winslow et Walker rapportent que *B. coli* est plus souvent d'origine fécale que les autres coliformes connus
- 1914 Le service de santé publique des États-Unis émet une première réglementation concernant la qualité microbiologique de l'eau: moins de deux échantillons de 10 mL sur 5 peuvent être positif pour *B. coli* pour considérer l'eau propre à la consommation
- 1915 Le service de santé publique des États-Unis délaisse la détection de *B. coli* pour celle des coliformes sous prétexte qu'ils sont des indicateurs équivalents
- 1919 Castellani et Chalmers renomment la bactérie *B. coli*, *Escherichia coli*, en l'honneur de son premier observateur
- 1938 Élaboration du test IMViC (Indole, Methyl red, Voges-Proskauer and Citrate) pour différencier les coliformes fécaux des coliformes environnementaux
- 1948-50 L'Angleterre utilise le test de l'indole pour identifier *E. coli* alors que les États-Unis identifient les coliformes thermotolérants sur la base de la production de gaz et d'acide à 44°C lors de la fermentation du lactose
- 1930-50 La plupart des pays développés utilisent la chloration comme traitement de l'eau de consommation
- 1953 Watson et Crick déterminent la structure en double hélice de l'ADN
-

1974	L' <i>United States Environmental Protection Agency</i> met en place sa réforme <i>Drinking water Act</i> décrivant une série de normes concernant la qualité de l'eau de consommation
1975	Première épidémie d'origine hydrique impliquant <i>E. coli</i> entérotoxigène
1980	L'Union Européenne établit ses propres standards (80/778/EEC) s'appliquant à l'eau de consommation
1983	Invention de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) Première présentation à la conférence <i>Water Quality Treatment</i> d'une méthode moléculaire pour la détection de pathogènes transmis par l'eau (hybridation par dot-blot)
1986	Première utilisation de la technique de séparation immuno-magnétique pour la récupération des pathogènes d'origine hydrique L'US EPA adopte <i>E. coli</i> comme indicateur de contamination fécale
1988	Développement de la méthode Colilert [®] pour la détection des coliformes totaux et d' <i>E. coli</i>
1990	Première utilisation du PCR pour la détection des pathogènes transmissible par l'eau
1993	Épidémie de <i>Cryptosporidium</i> sp. à Milwaukee, Wisconsin, États-Unis
1995	Seule épidémie de <i>Toxoplasma gondii</i> répertoriée dans un pays développé (Canada)
1996	Démonstration de la grande résistance des adénovirus aux rayons UV
1998	L'Union Européenne adoptent <i>E. coli</i> et les entérocoques comme indicateurs de la qualité microbiologique de l'eau de consommation
2000	Épidémie d' <i>E. coli</i> à Walkerton, Ontario, Canada
2001	Première utilisation de la technologie des <i>microarray</i> ciblant des pathogènes d'origine hydrique
2003	L'Organisation Mondiale de la Santé recommande l'utilisation d' <i>E. coli</i> en tant que meilleur indicateur de contamination fécale

L'eau a traditionnellement été évaluée avec des tests basés sur la révélation visuelle de réactions métaboliques simples. Ces tests incluent les techniques de fermentation en tubes multiples/nombre le plus probable et la filtration sur membrane. La réalisation de ces tests est abordable car ils requièrent peu de formation et de matériel. Les méthodes sont cependant lentes, non spécifiques et inhibées par de nombreuses composantes de l'environnement [8]. Elles sont, malgré tout, largement utilisées dans les programmes de surveillance de la qualité microbiologique de l'eau [32].

1.1.2.2.1 Échantillonnage de l'eau environnementale

Il n'existe pas de norme internationale en matière d'échantillonnage de l'eau environnementale dans le but d'en analyser la qualité microbiologique. Des juridictions telles que le gouvernement du Québec et l'US EPA ont cependant émis des recommandations permettant de limiter l'impact de l'échantillonnage sur le contenu bactérien de l'échantillon. Ces normes incluent 1) utiliser des bouteilles de collecte stériles, 2) d'assurer la clarté de l'eau (limiter la turbidité engendrée par l'échantillonnage), 3) ne jamais toucher au rebord du goulot avec les doigts ou tout objet, 4) garder le bouchon d'une main et pencher la bouteille de l'autre afin d'orienter le goulot vers l'amont de la rivière ou du lac, 5) plonger la bouteille en effectuant un mouvement en « U » 6) replacer avec précautions le bouchon de la bouteille sans toucher aux rebords, 7) clairement identifier l'échantillon avec un crayon indélébile en écrivant au moins le lieu, la date et les initiales de l'échantillonneur, 8) préserver les échantillons en les mettant dans une glacière avec de la glace et 9) transporter les échantillons en deçà d'un délai raisonnable (4-6 heures) [80].

1.1.2.2.2 Nombre le plus probable

En 1914, le service de santé publique des États-Unis émet donc une première réglementation concernant la qualité microbiologique de l'eau de consommation (Tableau 3): un maximum d'un échantillon d'eau de 10 mL sur 5 peut se révéler positif pour les coliformes thermotolérants ou *E. coli*, sans quoi l'eau est considérée impropre à la consommation. Ces analyses étaient réalisées en utilisant une méthode alors nommée la technique de fermentation multitube (*multiple-tube fermentation procedure*) et requéraient l'inoculation de trois séries de trois bouillons tous composés de lauryl tryptose ou de

lactose, par des aliquotes de 10, 1 et 0.1 mL d'échantillon d'eau à analyser respectivement. La croissance sélective des microorganismes et la production de gaz, suite à une incubation de 24 à 48 heures à $35\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, sont alors toutes deux nécessaires pour considérer un résultat positif pour les coliformes totaux. Pour la confirmation et la numération des coliformes thermotolérants, des inoculas des tubes positifs pour la présence de coliformes totaux sont réincubés de manière aseptique dans des tubes de milieu composé de lactose, de vert brillant et de sels biliaires à 2%. Ces tubes sont incubés à $44.5\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ pendant 24 ± 2 heures, après quoi sont analysées de nouveau la croissance et la production de gaz. La numération est réalisée en comptabilisant le nombre de tubes ayant de la croissance parmi les 3 séries. Cette donnée est ensuite rapportée sur la table de statistiques du nombre le plus probable. Les résultats sont alors exprimés sous forme de « nombre le plus probable (NPP) de coliformes thermotolérants/100 mL ». Le NPP est en fait une évaluation statistique du nombre de bactéries et non le décompte réel de bactéries présentes. Ce besoin d'interprétation découle du fait que les entités qui donnent lieu à des colonies ou à de la croissance en milieu liquide, ne sont pas des bactéries libres mais probablement des agglomérats de bactéries nommés unités formatrices de colonies (UFC). L'unité de la table de NPP est donc l'UFC/100 mL.

Des méthodes ne requérant pas de seconde incubation pour assurer l'identification ont fait leur apparition à la fin des années 1980. L'utilisation première de milieu dit « à substrat défini » pour la détection des coliformes à partir d'échantillons d'eau est attribuable à Edberg en 1988 [81]. En réponse aux limites imposées par les techniques de fermentation multitube, Edberg développe une méthode de croissance en culture liquide utilisant un milieu composé d'un substrat enzymatique propre au microorganisme ciblé. Des troupes ont depuis été développées afin de permettre une détection plus sensible, spécifique et rapide des coliformes totaux, d'*E. coli* et des entérocoques [8]. Par exemple, la trousse Colilert® (IDEXX, Maine, États-Unis) pour la détection des coliformes totaux et d'*E. coli* se basent respectivement sur l'activité des enzymes β -D-galactosidase et β -D-glucuronidase (Tableau 3). Ces enzymes hydrolysent spécifiquement des substrats chromogéniques ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) et 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG), présents dans le milieu. Cette trousse est utilisée de routine dans toutes les

communautés autochtones canadiennes éloignées des centres urbains, tel au Nunavik et chez les Cris de la Baie James. Ce milieu a par ailleurs longtemps été nommé MMO-MUG pour *minimal media ONPG MUG*. La trousse Enterolert™ (IDEXX, Maine, États-Unis) est quant à elle composée de 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside (MUD) et se base donc sur l'activité de l'enzyme β -D-glucosidase pour détecter les entérocoques.

Une des principales préoccupations concernant l'utilisation de telles méthodes réside dans l'interférence que pourrait créer d'autres microorganismes retrouvés dans l'environnement. En effet, la β -galactosidase a été retrouvée chez d'autres bactéries, telles les *Pseudomonadaceae* et *Neisseriaceae*, ainsi que chez des levures, des protozoaires et des mycètes [82].

1.1.2.2.3 Filtration sur membrane

Depuis l'élaboration de la méthode de détection des coliformes thermotolérants utilisant le milieu m-FC [83], de nombreuses techniques de filtration sur membranes ont été mises au point pour l'évaluation de la qualité microbiologique de l'eau [84]. Cette technique de détection consiste à filtrer un échantillon d'eau (100 mL) pour récupérer les bactéries sur une membrane de faible porosité (0.45 μ m), grâce à l'aspiration exercée par une pompe à vide. La membrane est ensuite incubée sur un milieu gélosé à des températures déterminées et pendant un intervalle de temps qui dépend de la méthode utilisée. Des techniques de filtration sur membrane (FM) sont disponibles pour la détection des indicateurs de contamination fécale et tout autre pathogène bactérien pour lequel il existe une méthode de culture (*Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio*).

La méthode de détection des coliformes totaux par FM a d'abord été développée par McCarthy, Delaney and Grasso [85]. Elle comprend une étape d'identification présomptive qui consiste à incuber la membrane filtrante sur milieu Lauryl Tryptose ou Lauryl Sulfate à $35\pm 0.5^\circ\text{C}$ durant 1.5 à 2.5 heures. La membrane est ensuite transférée dans une boîte de Petri contenant du milieu m-ENDO LES (*Lawrence Experimental Station*) qui est incubée à $35\pm 0.5^\circ\text{C}$ durant 22 ± 2 heures. Ce milieu lactosé permet la croissance sélective et différentielle ainsi que l'identification et le dénombrement des coliformes totaux grâce aux

agents inhibiteurs (désoxycholate de sodium et du lauryl sulfate de sodium) et à l'indicateur de pH (fuschine). Les colonies rouges métalliques sont considérées positives.

La méthode de détection des coliformes thermotolérants utilisant le milieu m-FC a été développée par Geldereich en 1965 [85]. Cette méthode requiert une incubation des boîtes de Petri à $44.5\pm 0.2^{\circ}\text{C}$, idéalement par immersion dans un bain thermostaté. Ce milieu lactosé est composé de sels biliaries qui inhibent la croissance des bactéries à Gram positif. Les agents différentiels de ce milieu sont l'acide rosolique et la bleue aniline. Les colonies de coliformes thermotolérants apparaissent donc sous différentes teintes de bleu.

D'autres méthodes de détection sur membranes filtrantes sont aujourd'hui disponibles, tel que publié dans la dernière édition du *Standard Method for the Examination of Water and Wastewater* [80]. On y retrouve des méthodes de détection des coliformes totaux et d'*E. coli* utilisant le milieu *modified membrane thermotolerant Escherichia coli* (mmTEC) ou encore le milieu *membrane indoxyl- β -D-glucuronide* (MI) [86], originalement développé par Dufour et collègues en 1981. La méthode permettant la détection des entérocoques utilise le milieu *membrane enterococci indoxyl β -d-glucoside* (mEI) [87].

1.1.2.3 Limites des méthodes classiques de détection

Ces deux dernières méthodes d'évaluation de la qualité microbiologique de l'eau sont très utilisées mais présentent de nombreuses limites. De telles analyses microbiologiques requièrent habituellement entre 24 et 48 heures, temps durant lequel de nombreuses personnes courent le risque d'ingérer l'agent pathogène. De plus, des densités élevées de bactéries non-coliformes et la présence de composantes inhibitrices dans l'environnement peuvent réduire la sensibilité de détection [52, 88]. Ces techniques ne peuvent non plus servir à détecter les microorganismes pathogènes non bactériens (virus et parasites) [26], on leur reproche conséquemment le mince spectre de microorganismes pouvant être détectés. Il est aussi impossible d'analyser la présence de plus d'une seule cible par échantillon d'eau (100 mL), ce qui diminue la capacité à analyser la présence simultanée des indicateurs fécaux et des pathogènes bactériens. Ces méthodes accusent aussi un manque d'universalité, c'est-à-dire leur habileté à détecter tous les représentants d'un organisme ou d'un groupe

d'organismes visés. Dans l'environnement, certaines bactéries survivent dans un état de faible activité métabolique. Ces bactéries sont dites viables mais non-cultivables (VBNC), elles ne sont pas détectables par les méthodes de culture sur milieu et plusieurs espèces pathogènes, dont différents sérotype d'*E. coli*, ont été retrouvées dans cet état [89-91].

1.2 Standards actuels de qualité microbiologique de l'eau de consommation

La qualité microbiologique de l'eau de consommation a traditionnellement été évaluée à l'aide de techniques permettant la détection d'indicateurs de contamination fécale. Depuis l'émission du premier standard en matière de qualité de l'eau de consommation en 1914, le raffinement des méthodes de détection et l'augmentation du niveau de connaissances sur les microorganismes entériques ont permis la découverte de nouveaux indicateurs ainsi que l'évolution des standards. Ces standards diffèrent d'un pays à l'autre, d'une province à l'autre (Tableau 4). Dans le contexte des présentes recherches, les standards locaux (Québec) seront comparés à ceux émis par d'autres entités juridiques.

Au Québec, les indicateurs bactériens recommandés pour l'évaluation de l'eau de consommation sont les coliformes totaux, les coliformes thermotolérants, *E. coli*, les entérocoques, *C. perfringens*, de même que les colonies atypiques (colonies bactériennes qui n'ont pas la couleur vert métallique lors du dénombrement des coliformes par la méthode de la membrane filtrante sur le milieu m-FC) et les bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies (BHAA) [92] (Tableau 4). Les normes québécoises recommandent l'absence des coliformes thermotolérants, d'*E. coli*, des entérocoques, de *C. perfringens*, de même que des colonies atypiques dans 100 mL d'eau ainsi que moins de 10 coliformes totaux dans 100 mL.

Les méthodes employées par le centre d'expertise en analyse environnementale du Québec comprennent la filtration sur membrane utilisant les milieux m-ENDO pour les coliformes totaux et m-FC pour les coliformes thermotolérants. Les protocoles de réalisation de ces méthodes et des contrôles appropriés ne sont cependant pas écrits pour assurer leur reproductibilité de manière contrôlée.

Au Canada, la section 92 de la Constitution canadienne octroie aux provinces la juridiction de l'eau de consommation. Il existe cependant un comité composé de membres fédéraux et provinciaux qui sont responsable de la publication et de la révision d'un Guide des recommandations concernant l'eau de consommation [67]. Officiellement, les seules

normes canadiennes concernant les paramètres microbiologiques de l'eau de consommation tiennent compte des concentrations de coliformes totaux, de coliformes thermotolérants et d'*E. coli*. Les normes émises par ce comité diffèrent de celles du Québec en ce sens qu'elles ne reconnaissent pas les entérocoques en tant qu'indicateur. De plus, selon ces normes la concentration limite des coliformes totaux est à 0/100 mL d'eau (Tableau 4).

Les lois et réglementations états-uniennes en matière de qualité de l'eau de consommation sont dictées par l'Agence de protection environnementale des États-Unis (*United States Environmental Protection Agency*; US EPA). Cet organisme a permis l'élaboration et l'approbation de différentes méthodes d'évaluation microbiologique de la qualité de l'eau. L'US EPA a financé le développement de méthodes de détection des coliformes totaux, des *Escherichia coli*, des entérocoques et des *Clostridium perfringens* afin d'évaluer le risque associé à la consommation d'eau potentiellement contaminée par des matières fécales [93, 94]. Les normes microbiologiques de l'US EPA diffèrent de celles du Québec uniquement sur la limite associée aux coliformes totaux, 0 UFC/100 mL et 10 CFU/100 mL respectivement. La norme de l'USEPA porte, de plus, une clause précisant qu'un maximum de 5% des échantillons évalués durant un mois peut être positif pour les coliformes (totaux et *Escherichia coli*).

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) stipule pour sa part que la présence d'une seule bactérie entérique, quelle qu'elle soit, n'est pas une donnée fiable en ce qui a trait à la sécurité microbiologique de l'eau. L'OMS attribue aux coliformes totaux le rôle de déterminer l'efficacité d'un traitement ainsi que d'évaluer la propreté des systèmes de distribution et la présence de biofilms. Ces microorganismes devraient donc être absents suite à la désinfection. Les normes de l'OMS sont dressées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Normes émises par différentes juridiction en matière de qualité microbiologique de l'eau de consommation

	Québec	Canada	US EPA	OMS	UE
Normes	Les normes québécoises de qualité de l'eau destinée à la consommation humaine du point de vue des paramètres microbiologiques se définissent comme suit [92]	Les normes canadiennes en matière de qualité de l'eau potable se définissent comme suit [67]	Les normes états-uniennes en matière de qualité de l'eau de consommation sont élaborées par l'US EPA et décrites dans le <i>Safe Drinking Water Act</i> [95, 96]	Les normes établies par l'OMS concernant l'eau de consommation sont les suivantes [31]	Les normes de l'Union Européenne relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles [97]
Indicateurs					
Coliformes					
totaux	10 CFU/100 mL	0 CFU/100 mL	0 CFU/100 mL*	0 CFU/100 mL	0 CFU/100 mL
thermotolérants	0 CFU/100 mL	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	0 CFU/100 mL	0 CFU/100 mL	0 CFU/100 mL*	0 CFU/100 mL	0 CFU/100 mL
Entérocoques	0 CFU/100 mL	-	-	-	0 CFU/100 mL
Autres					
coliphages mâles	0 PFU/100 mL	-	-	-	-
<i>C. perfringens</i>	-	-	-	-	0 CFU/100 mL
BHAA (22C)	-	-	-	-	100 CFU/100 mL
BHAA (35-37C)	500 CFU/100 mL	-	500 CFU/100 mL	-	20 CFU/100 mL

* maximum de 5% des échantillons évalués durant un mois peuvent être positifs pour les coliformes (totaux et *Escherichia coli*) sans quoi l'eau n'est pas considéré potable

1.3 Technologies émergentes

1.3.1 Techniques immunologiques

Les anticorps sont des glycoprotéines produites par les mammifères pour se défendre des substances étrangères de l'environnement. Ces glycoprotéines sont composées de domaines de reconnaissance et de liaison hautement spécifiques qui peuvent être dirigés contre des structures à la surface des pathogènes (antigène). Les techniques immunologiques reposent sur l'utilisation d'anticorps qui sont choisis pour leur spécificité envers un antigène de surface appartenant à un microorganisme ou un groupe de microorganismes cibles. De tels essais ont été développés pour détecter les indicateurs de contamination fécale à partir d'échantillons d'eau [98, 99]. Ces méthodes sont plus rapides que les méthodes classiques mais présentent cependant des faiblesses en termes de sensibilité [99] et de formation de réactions croisées et de faux positifs [98, 100, 101].

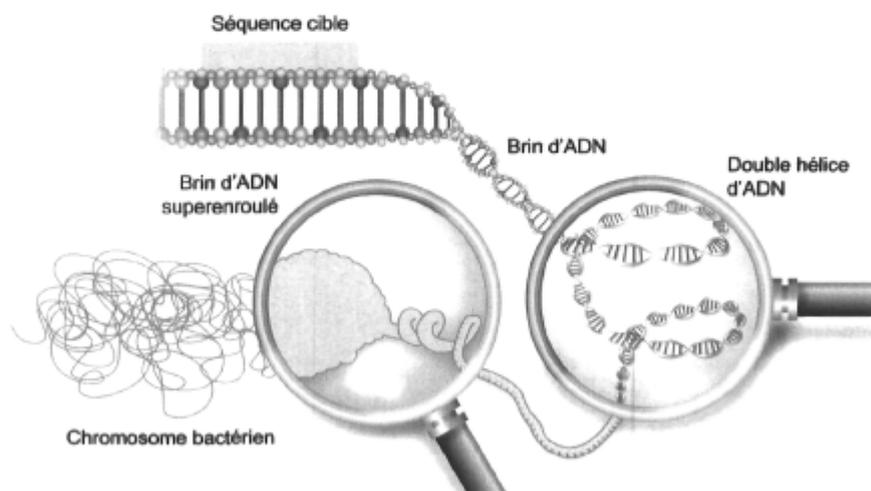
1.3.2 Détection des acides nucléiques

Au cours des deux dernières décennies, des méthodes de détection des acides nucléiques ont été développées en réponse aux nombreuses limites imposées par les méthodes classiques de détection. Les technologies moléculaires actuellement disponibles permettent la détection des microorganismes pathogènes en quelques heures sans avoir à effectuer des cultures [8]. La plupart des techniques basées sur la détection des acides nucléiques impliquent une étape d'hybridation moléculaire. Cette réaction implique la reconnaissance de séquences d'acides nucléiques complémentaires entre une séquence amorce et sa séquence cible. La technique la plus prometteuse dans la détection des pathogènes se base sur l'amplification spécifique d'une séquence d'acide désoxyribonucléique (ADN) cible, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Cette technique a été imaginée par Dr Kary Mullis en 1983. Elle se base sur l'utilisation de la polymérase à ADN ADN-dépendante thermostable isolée de la bactérie *Thermus aquaticus* [102]. La PCR consiste en une suite de 30 à 40 cycles de variations thermiques faisant réagir cette enzyme de *T. aquaticus*, ou *Taq*, avec des molécules d'ADN dont au

moins une comporte la séquence cible (Figure 1) ainsi qu'avec des amorces moléculaires qui permettent à l'enzyme de s'ancrer sur la séquence d'ADN cible.

Figure 1 : Illustration de l'organisation de la structure de l'ADN bactérien



Brièvement, les étapes principales de la PCR se succèdent comme suit :

- 1- Dénaturation à haute température (95°C) de la double hélice d'ADN cible en molécules simple brin
- 2- Hybridation des amorces aux séquences complémentaires sur les molécules simple brin, à des températures propres aux amorces appelées température d'appariement (55-60°C)
- 3- Élongation des amorces par l'ADN polymérase *Taq* (72°C)
- 4- Nombreuses répétitions de ce cycle de 3 étapes (30-40x)

Tableau 5 : Résultat général du thermocyclage permettant l'amplification spécifique d'une cible

Nombre de cycles	Copies de molécules d'ADN cible
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1 048 576
30	1 073 741 824

Au gré de ces cycles thermiques, l'enzyme entreprend donc l'élongation d'une séquence d'ADN spécifique. Cette spécificité est donnée par les amorces qui sont en fait de courtes molécules d'ADN dont la séquence est complémentaire à la séquence ciblée par la réaction. Le résultat de la suite répétitive de cycles est l'amplification spécifique et exponentielle de la séquence cible. Il est alors possible de détecter des séquences retrouvées en très faible concentration dans l'environnement. Il est aussi possible de transférer différents essais d'amplification dans un seul essai (multiplexe) en incorporant plus d'une paire d'amorces complémentaires à des cibles différentes. Ceci est un des grands avantages de la PCR, la possibilité de détecter de multiples microorganismes à partir du même échantillon [7, 103].

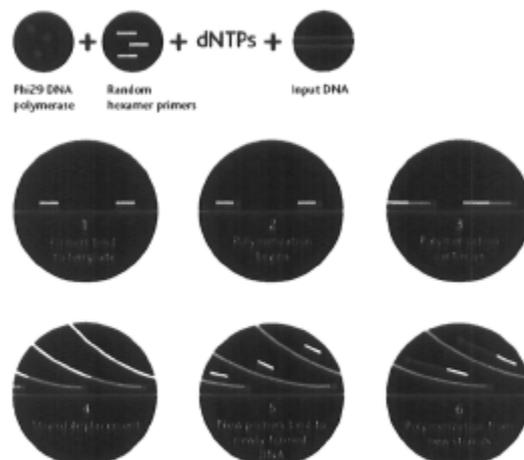
Les avancées technologiques et l'approfondissement des connaissances relatives au processus de la PCR permettent la réalisation de la détection d'une séquence cible en moins d'une heure [104], diminuant ainsi le temps d'exposition de la population à l'eau contaminée. De nombreux essais utilisant la PCR ont déjà été développés pour la détection spécifique des coliformes totaux [103, 105, 106], *Escherichia coli* [106-108] et *Escherichia coli* O157:H7 [109, 110].

Étant donné qu'il cible l'ADN, ce type de méthode ne discrimine pas les bactéries viables des VBNC ou des non-viables [10]. Comme il est admis que de nombreux microorganismes pathogènes se retrouvent dans ces états d'inactivité métabolique dans l'environnement, cette propriété de non-discrimination est nécessaire lorsqu'on veut vérifier le contenu en pathogènes de l'eau et ainsi protéger la santé publique [111]. Les méthodes de détection des acides nucléiques ont cependant des caractéristiques qui peuvent limiter leur utilisation dans l'environnement. Les méthodes peuvent être inhibées par des substances organiques et inorganiques retrouvées naturellement dans l'environnement tels les acides humiques [112, 113], les polysaccharides, des métaux et des minéraux [114]. Un autre problème réside dans le fait que les pathogènes sont généralement retrouvés en très faible concentration, ce qui nécessite le développement de techniques de concentration des échantillons. De nombreuses alternatives ont été développées afin de pallier à certains de ces désavantages. La PCR en temps réel, par exemple, a été développée afin de livrer les résultats quantifiables plus rapidement, sans étape d'analyse subséquente (séquençage, électrophorèse), réduisant ainsi le nombre d'étapes de manipulation ainsi que le risque de

contamination croisée [115]. De tels essais ont été mis au point pour des échantillons clinique et environnementaux [116] et plus récemment pour les indicateurs de contamination fécale [117, 118].

Une autre percée dans le monde de la biologie moléculaire est l'utilisation de la technologie d'amplification génomique aléatoire (*whole genome amplification*; WGA). Telle qu'illustrée à la figure 2, cette technologie implique l'utilisation de la polymérase à ADN ADN-dépendante du phage Phi29 de *Bacillus subtilis*. L'enzyme possède une forte activité 5'-3' de déplacement de brin (*strand displacement*) qui lui permet de séparer les deux brins d'une molécule d'ADN double brin et d'allonger un brin complémentaire d'une longueur allant jusqu'à 70 000 nucléotide en présence de nucléotides libres, sans se dissocier de la molécule matrice [119]. Des hexamères non spécifiques permettent la liaison de l'enzyme sur n'importe quelle séquence en ADN. La technologie a été adaptée par Amersham Biosciences [120] permet donc d'amplifier n'importe quelle molécule d'ADN. Cette technologie a été à la base développée pour amplifier des stocks d'ADN plasmidique ou génomique qui venait à manquer [121]. Elle est maintenant utilisée dans les milieux de recherches en médecine légales [122] et maintenant environnementale [123, 124].

Figure 2 : Composantes et principales étapes réactionnelles de l'amplification WGA utilisant la trousse GenomiPhiTM d'Amersham



Source: http://www4.amershambiosciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/phi29_dna_polymerase_whole_genome-genomiphi_work

Description du laboratoire mobile Atlantis

Le laboratoire mobile Atlantis (LMA) est un outil pour la surveillance environnementale et sanitaire se présentant sous la forme d'un complexe autonome, innovateur et unique de recherche scientifique. Il a été imaginé en 2001 et construit en 2002-2003 afin d'étudier les interactions entre la santé humaine et l'environnement particulièrement chez les populations côtières.

Figure 3 : Le laboratoire mobile Atlantis sous sa tente au Bermudes



(Source : www.atlantis.ulaval.ca)

Les défis du LMA se situent dans les domaines de 1) surveillance environnementale, 2) de validation de méthodes, 3) de sensibilisation/éducation du public et 4) de transfert technologique. L'Université Laval en est propriétaire et sa construction a été réalisée grâce au cofinancement apporté par d'importantes subventions de la Fondation Canadienne pour l'Innovation et du Gouvernement du Québec. Le complexe est conçu pour être efficacement transportable par terre ou par mer à de multiples destinations nécessitant des installations scientifiques complètes. Les 6 modules le constituant sont construits dans des conteneurs maritimes convertis et aménagés pour accueillir 4 professionnels de recherche à temps plein. Les laboratoires sont au nombre de trois: le module de microbiologie classique et moléculaire (MMCM), d'écotoxicologie et de chimie analytique. Les trois autres modules servent à assurer le bon fonctionnement avant, pendant et après chaque mission. Ils permettent la réparation ou la modification des modules, permettent aussi l'habitabilité ainsi que le transport du LMA, de ses appareils et de son personnel.

Le MMCM, comme son nom l'indique, permet l'utilisation de méthodes de microbiologie classique et moléculaire. Ces deux voies de détection permettent de déterminer la présence

environnementale d'indicateurs de contamination fécale et de pathogènes à partir d'échantillons d'eau douce. À bord de ce module, se trouve le matériel permettant la biologie moléculaire soit un thermocycleur T3 (Biometra, Whatman, Allemagne), une hotte biologique équipée d'un filtre HEPA, des Vortex-Genie 2 à têtes ajustables (Scientific Industries, New-York, États-Unis), des blocs thermostatés et programmables, une centrifugeuse, un congélateur (-20°C) ainsi qu'un jeu de micropipettes. Cloisonné dans la deuxième moitié du module se trouve le nécessaire de microbiologie classique. On y trouve 3 incubateurs, un système de production d'eau ultra-pure, un autoclave de table, des plaques chauffantes agitrices et des réfrigérateurs (4°C), une rampe de filtration, un microscope optique à fluorescence, en plus des surfaces de travail permettant la préparation et le traitement des échantillons d'eau et la préparation des milieux de cultures. Le module est aussi équipé d'une section dédiée à la prise de données géomatiques, essentielle au travail d'échantillonnage.

Les modules dédiés à la chimie et l'écotoxicologie permettent l'analyse des contaminants chimiques environnementaux. Parmi les contaminants analysés, on dénote nombre de biphénylpolychlorés (BPC) et de métaux lourds qui sont extraits de matrices diverses (ongles, cheveux, sang, urine, viande de poisson, etc.). Pour ce faire, ces modules sont équipés d'appareils de pointe incluant un spectromètre de masse-chromatographe en phase gazeuse (GC-MS) pour l'analyse des composés organiques (pesticides, BPC), d'un spectromètre par absorption atomique pour l'analyse des métaux et des composés organométalliques (cadmium, plomb, arsenic, etc.) et d'un spectromètre d'absorption atomique par vapeur froide utilisé spécifiquement pour l'analyse du mercure.

1.3.3 Le LMA en mission

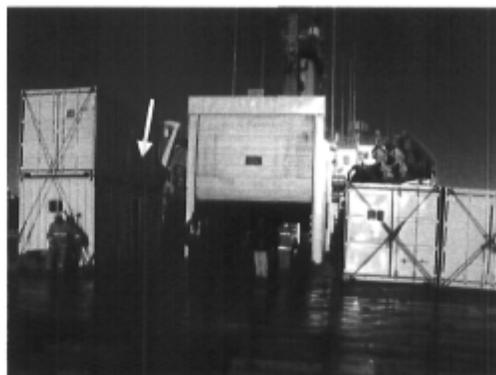
Le MMCM a été utilisé lors de trois études portant sur la santé publique et environnementale depuis l'été 2003. Le projet pilote eu lieu aux Bermudes en 2003. Le MMCM participa aussi à l'étude sur la santé publique et environnementale chez les Inuits du Nunavik, *Qanuippitaa?* (Comment allons-nous?), en automne 2004. Cette étude de grande envergure permit à deux étudiants du CRI, Andrée Maheux et Jean-Luc Bernier, de

se rendre dans les villages inuits du Québec à bord du brise-glace CCGS Amundsen (Figure 5), afin d'analyser la qualité microbiologique de différents types d'eau de consommation.

Figure 4 : Le MMCM à bord du brise-glace CCGS Amundsen lors de l'enquête de santé *Qanuippitaa?* en septembre 2005 [125].



Source: Martin Fortier - ArcticNet



Source: Jean-Luc Bernier – CRI, Nasivvik

La plus récente étude impliquant le MMCM s'est déroulée en sol cri, dans la communauté de Mistissini (Québec). Nommée *Nituuchischaayihitaa au aschii* (Apprenons à connaître notre terre), cette étude de santé publique et environnementale est décrite en détail dans le Chapitre II « *On-site Microbiological Quality Monitoring of Environmental Drinking Water in Cree Community of Mistissini* ».

Le but téléologique visé par l'équipe du MMCM est de caractériser les risques d'exposition des communautés visitées aux contaminants d'origine fécale retrouvés dans l'eau brute utilisée comme eau de consommation. Le travail principal des membres du MMCM durant ces trois missions a été d'évaluer la présence d'indicateurs bactériens de contamination fécale à partir d'échantillons d'eau de consommation à l'aide de méthodes de microbiologie classique réalisées à bord de ce laboratoire mobile.

1.4 Objectifs de recherche

1.4.1 Objectifs

L'objectif principal de la présente recherche est d'évaluer la capacité du MMCM à réaliser une campagne de surveillance de la qualité microbiologique de l'eau brute utilisée comme eau de consommation en régions éloignées. Les travaux ont débuté par l'adaptation des procédures de microbiologie classique d'analyse de l'eau aux particularités opérationnelles du MMCM. Ces procédures ont ensuite été validées lors d'une campagne de santé publique dans le nord du Québec, en territoire cri. Il a aussi été possible de commencer l'adaptation et le transfert de nouvelles méthodes moléculaires afin de les rendre opérationnelles sur le MMCM.

1.4.1.1 Objectifs spécifiques

- Élaborer des protocoles de recherche afin d'appliquer validement des méthodes de microbiologie classique à bord du MMCM.
- Effectuer une analyse comparative de différentes méthodes de microbiologie classique effectuées à bord du MMCM en région éloignée.
- Tester lors d'une étude longitudinale les méthodes de microbiologie classique afin de valider les protocoles de recherches élaborés et de s'assurer une base de comparaison lors du transfert de méthodes moléculaires.
- Adapter puis transférer deux méthodes de détection moléculaire ciblant les *Escherichia coli* et les entérocoques afin de permettre leur transfert sur le MMCM du LMA.

Chapitre II

On-site Microbiological Quality Monitoring of Raw Drinking Water in Cree Community of Mistissini

Jean-Luc T. Bernier^{1,2}, Andrée F. Maheux^{1,2}, Maurice Boissinot^{1,2}, François J. Picard^{1,2}, Luc Bissonnette^{1,2}, Daniel Martin³, Éric Dewailly³, and Michel G. Bergeron^{1,2*}

¹Centre de recherche en infectiologie de l'Université Laval, Centre hospitalier universitaire de Québec (Pavillon CHUL), Québec (Québec), Canada, G1V 4G2.

²Division de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec (Québec), Canada, G1K 7P4.

³Unité de Recherche en Santé Publique, Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUL), Québec (Québec), Canada, G1V 2M2.

*Corresponding author Mailing address: Centre de Recherche en Infectiologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, 2705 Boul. Laurier, Québec (Québec), Canada, G1V 4G2. Phone: (418) 654-2705. Fax: (418) 654-2715. E-mail: Michel.G.Bergeron@crchul.ulaval.ca

Running title: On-site monitoring of drinking water in Cree community

Résumé

L'accès à l'eau potable est un enjeu majeur pour les autochtones du Canada. L'objectif principal de cette étude était de détecter les indicateurs fécaux dans l'eau brute utilisée comme eau de consommation par les Cris de la communauté de Mistissini (Province de Québec) durant la période estivale de 2005. Des techniques de filtration sur membrane et de nombre le plus probable ont été utilisées à bord du laboratoire mobile Atlantis pour détecter les coliformes totaux, *Escherichia coli* et les entérocoques. L'analyse des résultats indique l'absence de corrélation significative quand à la distribution et la concentration entre les trois indicateurs fécaux détectés dans les sites environnementaux. Les résultats permettent

aussi de constater que les contenants d'eau portatifs contiennent moins d'*E. coli* et d'entérocoques que les sources d'eau brute. L'étude met en doute la pertinence de l'utilisation de ces indicateurs et souligne le besoin de développer des nouvelles méthodes pour évaluer la qualité microbiologique de l'eau dans les régions éloignées.

Abstract

Access to safe drinking water is a major concern for Canada's First Nations. The main objective of this study was to monitor fecal indicator microorganisms in raw drinking water used by Cree people of Mistissini (Province of Québec, Canada). Microbiological detection of total coliforms, *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. were performed using membrane filtration and Most Probable Number methods. All tests were accomplished onboard the Atlantis Mobile Laboratory, a multidisciplinary scientific research facility that consists of self-reliant portable laboratories including a microbiology module. Twelve environmental sites and 24 portable water containers used for water collection and storage were sampled during the summer of 2005. *E. coli* counts in environmental sites ranged from <1.0 to 78.4 CFU/100 mL and *Enterococcus* sp. counts varied from <1.0 to 200.5 CFU/100 mL. Interestingly, a greater number of river samples (33) contained *E. coli* compared to lake samples (9), while *Enterococcus* sp. showed the reverse distribution (15 vs. 23). Out of 24 portable water containers, two (2) were contaminated with *E. coli* and four with *Enterococcus* sp. The targeted fecal indicators were observed to be quantitatively distributed independently from each other. Data also suggests that the microbiological quality of environmental drinking water was enhanced using local collection and storage practices. This study stresses the need to seek innovative strategies to monitor fecal contamination in remote areas.

Keywords: Atlantis Mobile Laboratory, drinking water, fecal indicator microorganisms, water microbiology

Introduction

Water is a key determinant of health, as it is an important vector of transmission for many of the most widespread and debilitating diseases that afflict humanity [1]. In order to use water of healthy microbiological quality, more than 90% of North-Americans use public treated water [2]. However, as Drangert reports: "*Water quality is a concept that includes taste, odour, colour, appearance, softness, temperature, as well as bacteriological and chemical properties*" [3]. Humans use some or all of these criteria to select drinking water. The World Health Organization (WHO) considers that the distrust of tap water and the dislike of chlorine taste can lead communities to use high-risk water sources [4]. In Canada, a significant number of the indigenous people continue to follow a traditional lifestyle, close to the land and relying on natural resources [5, 6]. They consider that natural water lives, inspires, heals, and prophecizes and that by their nature, springs and rivers display power, life, and perpetual renewal [7]. As such, they prefer water collected from lakes, rivers, and creeks, over tap water. This was recently observed in the province of Québec, where 30% of Nunavik's Inuit population uses environmental water for tea and juice preparation [8]. However, such water cannot be guaranteed free of infectious microorganisms such as viruses, bacteria, and protozoan parasites. In fact, contemporary realities favour the increasing occurrence, migration, and emergence of waterborne infectious diseases associated with industrial activities such as hydroelectric development [9], rapid urbanization in developing regions [10], overcrowding [11] and climate change [12, 13]. These trends can actually render sanitation capabilities inadequate and stress water supplies [14, 15]. It seems to be particularly the case for Canada's native peoples who are at increased risk of waterborne enteric illness due to poor availability of safe drinking water in remote areas [16]. The *Nituuchischaayihititaa au aschii* ("Let us know our land") study was initiated by the Cree Board of Health to address issues of environmental contamination and their impacts on human health.

One of the objectives of this study was to analyse the microbiological quality of water drunk by Cree population of Northern Québec. Microbiological tests targeted fecal indicators, which comprised three commonly used bacterial groups: total coliforms, *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. Total coliforms are described as an indicator of

treatment effectiveness and are used to assess the cleanliness and integrity of distribution systems and the potential presence of biofilms [17]. According to the United States Environmental Protection Agency (US EPA), total coliforms must be absent from drinking water samples of 100 mL [18]. *Escherichia coli* is considered the most suitable indicator of fecal contamination [17, 19, 20], because it is present in all warm-blooded animals [21], and it is rarely found in the absence of fecal matter [21]. US EPA drinking water standards also require the absence of *E. coli* in 100 mL samples. The *Enterococcus* sp. group was also used as an indicator of fecal pollution as it complements testing for *E. coli* [17]. As recommended by the Government of Québec, enterococci must be absent from 100 mL samples of drinking water [22].

In this study, we report on-site microbiological monitoring of frequently visited environmental sites used as drinking water sources by Cree inhabitants of Mistissini over a period of 30 days, during the summer of 2005. Microbiological testing was entirely performed onboard the classic and molecular microbiology (CMM) module of the Atlantis Mobile Laboratory (AML), which is a multidisciplinary scientific complex designed for on-site water contaminant monitoring in remote areas (Figure 1).

(This study was presented in part at the 6th ACADRE Annual Student Gathering, Hamilton, Ontario, Canada, June 21-25 2006.)

Materials and methods

Sampling program

Environmental sites

The 12 most frequently visited environmental sites were identified by local water specialists and local environment administrator of Mistissini as drinking water sources commonly used by the Cree community members (Figure 2). Sites were classified as lakes and rivers. Although the local Cree inhabitants may use a different toponymy, landlocked, naturally occurring stretch of calm water were classified as lakes, (Perche River, Wapachee Camp, Km 357, Km 357 camp, South Revelation River camp and South Revelation River launching dock). Streams of visibly flowing water that altered the nearby landscape were defined as river sites (Perche River Bridge, Icon River, Chalifour Camping, Chalifour River Bridge, South Revelation River and North Revelation River). The sites are all located within a 60 kilometer (km) radius of Mistissini (Figure 2). Each site was visited between 3 to 10 times, from July 20th to August 18th 2005. Frequency of visit depended upon transportation availability and the relative importance of these sources of drinking water for interviewed community members. An inversely proportional relationship exists between the number of people visiting a given site and its distance from Mistissini. Thus, the less frequently visited sites were at greater distance from the community.

Sampling method

Water sampling was performed between 9am and 1pm. Instructions from accompanying local water specialists were carefully reproduced, in order to mimic local practices for collection of water samples. Briefly, water was collected at the surface of the lake or river, from the traditional collection spots, off the lake or river shore or at the end of a dock. Samples from the selected environmental sites were collected in 1 L plastic bottles (Nalgen, Nunc International, Rochester, NY, USA), transported in a cooler with frozen ice packs, and processed for analysis within 4 hours [23].

Abiotic parameters that may impact the fate of allochthonous micro-organisms in freshwater,

such as water temperature, turbidity and pH, were measured at sampling sites [18], using the Orion 250Aplus Advanced Portable pH Meter and turbidity meter (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). Field data was archived on-site on US EPA's "Water Quality Sampling Field Data Sheet" [24]. Total rain data was compiled from the daily weather report out of Chibougamau/Chapais airport, 85 km south of Mistissini [25].

Portable water containers

Twenty-four (24) Cree families participating in the *Nituuchischaayihititaa aschii* study were visited between 7:30am and 9:30am in order to sample their portable water containers. Although every visited household owned a portable water container, 3 out of 24 of these containers were empty at the time of sampling. Each household was visited once for water collection. Two 120 mL sterile vessels (IDEXX, Westbrook, ME, USA) were used for Colilert[®] and Enterolert[™] analysis of 100 mL water samples as instructed by the manufacturer (IDEXX, Westbrook, ME, USA). Samples were kept on frozen ice packs and processed within 4 hours of collection, as described in the section concerning the most probable number method. Participants were interviewed, during these single domestic visits, about water drinking-related habits (Table 2). Questions asked were:

- "Where do you take your drinking water or water used for cooking or to prepare juice or tea?"
- "If you take water outside, could you give us the location (name or reference on a map)?"
- "Where do you store the water you collect outside? (Type of container: metal or plastic?, open or closed?, opaque or transparent?)?"
- "When is the last time you cleaned your container? (week / month / 6 months / year)"
- "How many times a year do you get water from environmental sources? (week / month / 6 months / year)"
- "Do you use a filtration device? If yes, describe the type of filtration device".

Microbiological detection methods

Reference strain cultures

Microbiological methods were conducted and results were analyzed in Mistissini, onboard the Atlantis CMM module. Controls for detection methods were performed using *E. coli* ATCC 11775 and *E. faecalis* ATCC 19433. Identification of these reference strains had previously been confirmed using MicroScan WalkAway system (Dade International Inc., West Sacramento, CA, USA). Both control bacterial strain were obtained from frozen stocks kept at -80°C, in brain heart infusion (BHI) medium containing 10% glycerol, then cultured on sheep blood agar. Broths were inoculated with isolated colonies in order to reach the logarithmic phase of growth. These cultures were aseptically ten-fold serially diluted in sterile PBS (137 mM NaCl, 6.4 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCL, 0.88 mM KH₂PO₄). One hundred (100) µL from both 10⁻⁵ dilution was spiked in two separate 10 mL sterilized PBS samples, in order to conduct quality control of microbiological detection methods.

Detection method validation and controls

Validation tests and controls ensured result reliability onboard the CMM module. Positive controls consisted of sterilized PBS, aseptically inoculated with a 100 µL dilution of reference strain cultures obtained as described above, and negative controls consisted of 100 mL of sterilized ultra-pure quality water. Sheep blood agar (SBA) was used to validate the quality of all freshly made media by comparing bacterial recovery, which threshold was set at 80%.

Most probable number method

Seventy-four (74) sub-samples from the 12 environmental sites, 21 samples from portable water containers, and appropriate control samples were analysed for total coliforms and *E. coli* using Colilert[®] (SM 9223, [26]), as well as for *Enterococcus sp.* using Enterolert[™] (ASTM D6503-99, [26]). The latter test is used in autochthonous communities across Canada as recommended by Health Canada. The most probable number (MPN) methods used in this study rely on selective growth and the detection of chromogenic and

fluorescent by-products. One litre water samples were shaken vigorously during 30 seconds and two 100 mL fractions were aseptically aliquoted into 120 mL sterile vessels (IDEXX, Westbrook, ME, USA). Colilert[®] media was aseptically added to the first sub-samples. Vessels were gently shaken and liquid cultures were transferred in pre-identified Quanti-Tray[®] culture pouches [26], which were heat-sealed using IDEXX's sealer (IDEXX, Westbrook, ME, USA). The pouches were then incubated at $35\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ for 24 hours, according to the manufacturer's instructions. Similarly, Enterolert[™] media was added to the second set of sub-samples. Resulting liquid cultures were also processed in Quanti-Tray[®], and the tests were incubated at $41\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ for 24 hours (Enterolert[™] Test Kit). Positive results for total coliforms, *E. coli* and enterococci were quantified using the provided MPN table (IDEXX, Westbrook, ME, USA).

Membrane filtration analysis

Thirty-five (35) sub-samples from the 74 samples collected at environmental sites, as well as previously described control samples, were analysed by membrane filtration (MF) method using mEI agar, for the specific microbiological detection of *Enterococcus* sp. [27, 28]. Remains of the one liter samples were again vigorously shaken for 30 seconds, and fractionated into 100 mL sub-samples, using calibrated stainless steel funnels from Millipore's filtration manifold (Millipore Corporation, Billerica, MN, USA). Vacuum-driven filtration was performed using 0.45 μm GN-6 Metricel membranes (Pall Corporation, Ann Harbor, MI, USA), which were deposited on the manifold. Filtration funnels were rinsed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) after each sub-sample filtration for maximum recovery [28]. Membranes were aseptically lifted and deposited onto mEI agar plates (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), which were incubated 24 hours at $41\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, for specific detection and enumeration of enterococci. mEI media was prepared fortnightly to insure freshness and maximum bacterial recovery. Fresh media were kept in the dark at 4°C until use. Stainless steel funnels and filter holder were UV sterilized between each round of sub-sample testing.

Statistical analysis

Nonparametric rank statistics, as proposed by Spearman, were evaluated using SAS system

(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)[29]. Statistical analysis was conducted to determine the strength of association within both abiotic parameter and microbial count data sets obtained from the study. Correlation coefficient (r_s) values between $0 > r_s > 1$ reveal that the variables tend to increase or decrease together where $r_s = 1$ represents a perfect correlation.

Results

CMM module operational validation

Prior to the initiation of our 30 days environmental sampling program, the CMM module operational procedures were validated by analyzing 37 environmental drinking water samples using MPN methods. Validation tests were performed in parallel onboard the CMM module and in the Mistissini pump station laboratory. Culture media were prepared and quality-controlled on-site in the CMM module where they always met the expected performance criteria. These data suggest that classical microbiology detection methods can be reliably performed on site using the AML CMM laboratory (Figure 1).

Abiotic parameter analysis

Specific abiotic parameters were monitored as part of the sampling program, as described above. Water temperature and pH were virtually constant throughout the study with respective averages of 18.6°C, and 7.0. Water turbidity varied, ranging from 0.4 to 3.2 nephelometric turbidity units (NTU), and averaged 1.1 NTU. Daily rainfall varied between 0 and 3.8 mm of water per day, with an average of 1 mm.

Environmental site samples

The presence of total coliforms, *E. coli* and enterococci was analysed in 100 mL fractions of environmental water samples, using specific MPN and MF methods. Total coliforms were found in all 74 samples and MPN counts ranged from 3.1 to >200.5 colony forming units (CFU)/100 mL (Table 1). In all samples, total coliform count averaged 161.78 CFU/100 mL. Samples from lakes and rivers contained respectively a mean of 132.6 and 191.0 total coliforms CFU/100 mL (Table 4).

During this study, *E. coli* was found in 68% of samples and at least once at each site (Table 3). *E. coli* counts ranged from <1.0 to 78.2 CFU/100 mL. Twenty-one percent (21%) of contaminated samples came from lake sites and contained an average of 3.1 *E. coli* CFU/100 mL, while the other 79%, which were from river sites, contained an average of 17.5 *E. coli* CFU/100 mL (Table 4).

Using Enterolert™, enterococci counts in all samples ranged from <1.0 to 200.5 CFU/100 mL. Fifty-three percent (53%) of the samples turned out positive for enterococci (Table 3). Sixty percent (60%) of positive samples were collected from lake sites, and contained an average of 8.5 enterococci CFU/100 mL. The remaining samples (40%), collected from river sites, contained an average of 2.9 enterococci CFU/100 mL (Table 4). Also, Mf method was used on the last 35 environmental samples. Using this method, enterococci counts ranged from 0.0 to 100.0 CFU/100 mL. Eighty-three percent (83%) of these tested sub-fractions were positive for enterococci (Table 3). Samples from lake sites comprised 45% of these contaminated samples and contained 16.0 enterococci CFU/100 mL. The remaining contaminated samples (55%) were from river sites and contained an average of 14.1 enterococci CFU/100 mL (Table 4). MF method indicated presence of enterococci while MPN suggested its absence in 20% of the 35 environmental water samples tested using both methods.

Drinking water-related habits

Every *Nituuchischaayihitaaau aschii* study participant surveyed for drinking water-related habits use environmental water which they collect and store in portable containers (Table 2). The majority of tested water samples had been collected from three environmental sites which had been previously selected and were part of CMM's environmental sampling program. Sixty-six percent (66.6%) of portable water containers were filled with water from Wapachee Camp (I), 16.6% from Km 357 (A), and 4.2% from Perche River (K). The remaining 12.5% contained water collected from unknown sites, other than the 12 environmental sites sampled during the study. On-site treatment of collected water by participants consisted of a single-step filtration through a canvas or cotton cloth (pillow case, drying cloth) to remove large particles such as insects or algae. Containers were filled with environmental water at irregular frequency, from once a week down to twice a year. Answers concerning cleaning frequency also varied from once a week to twice a year. Cleaning methods ranged from rinsing with tap water, to washing with a bleach solution and then rinsing with tap water. All containers were 18.93 liters (5 gallons), plastic made, and kept closed with a screwable lid. However, some containers were transparent, others opaque, and containers were either kept inside or outside the house.

Portable water container samples

Sixteen (16) out of the 21 sampled water containers contained total coliforms and were thus considered unfit for consumption according to US EPA standards (Table 2). Total coliform counts ranged from 1 to >200.5 CFU/100 mL (Table 2). Six (6) samples contained ≥ 200.5 total coliform UFC/100 mL, while the remaining 10 averaged 9.64 total coliform CFU/100 mL. Samples 12 and 18 contained *E. coli*, whereas samples 8, 10, 18, and 20 were contaminated with enterococci (Table 2). When present, levels of contamination for *E. coli* and *Enterococcus* were low, between 1 and 6.4 CFU/100 mL. One sample out of 21 showed presence of all three indicator microorganisms and its water had been collected at Wapachee Camp (Table 2).

Correlation analysis

Variation of fecal indicator counts over time was observed within all sites. However, correlation between microbial count fluctuation and time was not significant in itself. Nonparametric rank statistic analysis, using the Spearman correlation coefficient, showed that water turbidity and pH both significantly co-vary with total coliforms counts ($r_s=0.5$ and 0.4) as well as with *E. coli* counts ($r_s=0.6$ and 0.4) using Colilert[®]. Daily rainfall and enterococci counts using Enterolert[™] also correlated significantly ($r_s=0.2$). Water temperature did not correlate with any microbiological result ($p>0.05$). Analysis of enterococci count data sets did not reveal association between the two detection methods, Enterolert[™] and MF. Significant correlation was also not observed between *E. coli* and enterococci counts using respective Colilert[®] and Enterolert[™] methods.

Discussion

Microbiological quality of environmental water used for drinking was investigated in the vicinity of the Cree community of Mistissini (Northern Québec), during summer 2005. Water filtration and microbiological tests were validly performed using resources readily available onboard the Atlantis Mobile Laboratory (AML). To our knowledge this is the first report demonstrating the ability of a self-reliable mobile laboratory, for on-site microbiological assessment of water quality in remote areas. There have been reports of the use of mobile laboratories in atmospheric pollutant studies [30], aerosol analysis [31], in response to bioterrorism [32] as well as in environmental [33] and water quality assessment [34]. Compared to the AML these mobile laboratories served merely as sample transforming platforms, rather than permitting on-site full scale studies and analysis. In fact, when considering its autonomy and on-site efficiency, Atlantis Mobile Laboratory proved itself to be the 21th century version of Burchell's "African Wagon" [35].

Within the community of Mistissini, the microbiological monitoring of tap water is performed periodically by the local water operator. However, traditional drinking water habits promote the use of environmental water for consumption, water for which there is no surveillance program. The present study was conducted to examine the risk of this water of containing viral, bacterial, and protozoan waterborne human pathogens. At the moment, the presence/absence of such pathogens is best assessed by monitoring fecal indicator microorganisms. The CMM module of the AML is equipped with the necessary tools to perform controlled detection of selected indicators using appropriate methods recommended by the US EPA. All results were obtained on board the CMM module within 24 hours, time period required for bacterial growth and chromogenic by-product detection.

Lake and river samples each represented 50% of total environmental surveillance program samples. Water samples collected from environmental sites revealed a wide range of total coliforms, *E. coli*, and enterococci concentrations. All sites exceeded at least once the maximum contaminant level for all three indicators when diagnosed with MPN technique [18]. Their presence was not surprising in the environment since there is growing evidence that support the non-restrictive character of fecal material as the unique source of these

microorganisms. In fact, non-point sources of fecal indicator bacteria have been reported to derive from a variety of habitats: beach sand, riparian sediments, water, and soil [36-41]. These habitats include tropical environments [38, 42, 43], but also temperate environments [44]. In addition, community members constantly travel around the study's sampling area for freshwater, food, and medicine plants as well as to retreat in the bush. Environmental sites are therefore prone to recontamination by human fecal waste which may be at risk of containing pathogenic microorganisms [45-47]. However it is highly probable that such bacteria could also originate from non-human source [48], this was not verified. Although all sampled sites were in the same watershed, they were different from one another, some being lakes, others rivers. The heterotrophic plate count on SBA was performed on all 74 environmental samples to provide an indicator of the level of the background bacterial population, whose numbers far exceed those of the coliform group. Elevated background counts, as observed on SBA plates, are known to interfere with culture testing of indicator coliform bacteria [49]. Thus, there was a possibility of underestimating the fecal indicator load of environmental water samples during this study.

MPN data analysis reveals indicator-specific spatial distribution trends. Total coliforms were found in approximately the same concentration in lakes and in rivers, whereas the ratio of *E. coli* mean concentration in lakes/rivers was 0.2 (Table 4). Reversely, overall enterococci mean concentration was 2.9 times higher in lakes than in rivers (Table 4). The microbiological outcome of our study therefore suggests that within the sampled environmental sites, lakes had a lower *E. coli* and higher enterococci load than rivers. This trend has yet to be confirmed by other studies performing environmental water microbiological quality monitoring in remote areas of the taiga region.

MPN data also reveal site-specific fecal indicator preferences. During the study, lake samples contained 6 times less *E. coli* than enterococci CFU counts while rivers presented 2.7 more *E. coli* than enterococci CFU counts. Previous studies have shown that lakes and rivers were not prone to the same type of contamination. According to the 2000 National Quality Inventory [50], fecal indicators and pathogenic microorganisms are the top cause of impairment of United States rivers and streams. However, their presence is not reported as being of the top five causes of impairment of lakes, reservoirs, and ponds.

Abiotic and biotic parameters between lakes and rivers could explain this observation. Lakes, with their slower flow, provide a stable environment for the development of biofilm systems in air-water interface [51] and in sediments [52]. These are composed of numerous specialized ecological niches that provide metabolic products otherwise unavailable in the environment. Diversity flourishes and permits the development of a wide spectrum of organisms, from primary producers to predators. The latter organisms control by preying or grazing on allochthonous bacteria [53, 54], considerably diminishing the fecal bacterial load.

On the other hand, rivers provide a constant supply of oxygen, organic, and inorganic compounds and nutrients essential for bacterial growth and survival. Low temperature can also favour allochthonous microbial persistence [55] although river water temperature in this study was not lower than lake water temperature. The microbiology of rivers and streams has been very much neglected [56]. However, it is known that the sessile population exceeds the planktonic population by 3 to 4 logarithmic units in pristine streams [57] and that, in the absence of predators, fecal coliforms may be capable of persistence and growth in freshwater aquatic sediments [58]. It is possible that biofilm systems evolving in permanently changing environments, typical of streams, provide less predation and competition which would otherwise challenge survival of allochthonous microorganisms. Because dissolved oxygen content is a major difference between lake and river waters, photooxydation is another important factor to take into account [59]. While it has long been recognized that solar driven UV radiation has a negative effect on culturability of enterobacteria in aquatic environment [60, 61], recent studies have observed its lethal activity when combined with constant supply of oxygen, even in the absence of any thermal effects [62]. While it was demonstrated that fecal coliforms and *Escherichia coli* provide a similar indication of the level of fecal pollution in sunlight-exposed environmental waters, enterococci are inactivated far more rapidly [63]. In summary, allochthonous *E. coli* have a better survival rate in river water than lake water because of intrinsic ecology, and enterococci survive less in river water, in part because of its sensitivity to photooxydation [63]. These could explain both the overall higher load of fecal indicator bacteria in river samples, as well as the lower concentration of enterococci in river samples compared to lake samples.

Microbiological results from both methods suggest that lake or river water in the Mistissini area should not be directly used for drinking, since positive results for fecal contamination indicators are obtained at a high frequency. It was also found that traditional community habits favoured water collection from Perche River and Wapachee Camp. These drinking water sources are seen by the community as containing the purest water. Interestingly, this study demonstrated that these two sites are those presenting the lowest total coliform concentrations, the lowest number of contaminated samples with *E. coli* (Table 3), as well as having lower than mean *E. coli* and enterococci concentrations. The results of this study suggest that water collected from these two sites as described in Table 2 can be regarded as the most acceptable of all environmental drinking water used by Cree people of Mistissini.

Samples from portable water containers contained less total coliform, *E. coli*, and enterococci counts than the environmental sites from where these containers were filled (Table 1). While 71% of sampled water containers had total coliform counts above acceptable drinking water guidelines [18], both *E. coli* and enterococci were detected in respectively 9.1% and 13.4% of the samples. Apart from filtering with a cotton or canvas cloth when collecting water, community members did not directly treat their water. The low frequency of contaminated containers is probably due in part to the fact that they were most often filled from the least contaminated environmental sites. It can also reflect the post-collection death of target micro-organisms, or their induction into a viable but non-culturable state. Indeed bacteriostatic and/or bactericidal effects have been known to be associated with crude simple filtration methods [64], heat [65], and heat combined with UV radiation resulting from sunlight exposure [66, 67]. Such effects have also been correlated with proper water collection practices [68], the use of covered containers [69], and with the presence of residual cleaning agents (hypochlorite acid) in the water containers and funnels [70]. In addition, while bringing stored water to room temperature favours microbial growth, the low concentration of nutrients and oxygen content, which is not supplied in such closed system, quickly limit viability and growth. This would suggest that appropriate collection and storage in covered containers can limit target bacterial population growth and survival in untreated natural water, bringing fecal indicators under drinking water guidelines, and thus potentially reduce human contact with microbial waterborne contaminants. Past studies on microbial persistence and survival in water containers have

also reported microbial inactivation [71, 72]. Another study analyzed the parameters affecting coliform regrowth [73]. Further investigation on the fate of pathogenic enteric viruses, bacteria and parasites in containers used by the Cree and relations with the persistence of fecal indicators should be initiated to assess the risk associated with the community practice of drinking stored environmental water.

Significant associations between variations of microbial counts, water pH, temperature, turbidity, and daily rainfall data sets are also not an unexpected finding. These abiotic parameters could partially explain the variation in total coliform, *E. coli* and enterococci counts [74, 75].

Since the presence/absence results of the 3 different fecal indicator groups varied within the fractionated samples, water quality interpretation was dependent upon evaluated microorganism. Thus, this study stresses the need of using multiple indicators in order to address the issue of microbial water quality [76]. In fact, the absolute paradigm of *E. coli* being reliably used to detect human waste in the environment is fading [44]. Investigations of specific indicators of human or sewage contamination to assess environmental drinking water quality are actually under way in Canada [77]. Usefulness of such point-source indicator in remote areas could be assessed using the AML.

The methods used in this study were culture-based thereby requiring about 24 hours to reveal results. However, there is a need for more rapid, sensitive, specific, simple and affordable technology to detect specific waterborne pathogens. Atlantis demonstrated its capability for on-site unbiased testing by culture methods. However, faster innovative molecular diagnostic technologies based on nucleic acid detection are currently being developed to be performed onboard its CMM module. It has been often demonstrated that there is an equivocal correlation between the presence or absence of fecal indicators and that of fecal pathogens of viral (Hepatitis A and E, Adenovirus, Norovirus), bacterial (VBNC *Legionella pneumophila*, *Salmonella* Enteritidis or *Vibrio cholerae*) or parasitic origin (*Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *C. hominis*, *Giardia duodenalis*) [78-82]. By itself, this situation warrants the development and implementation of adaptable, sensitive, specific, cost- and time-effective methods for the detection of emerging

pathogens in water sources, especially those for which fecal indicators are inadequate in predicting their presence [83]. Future developments involving PCR and gene probe technology for the direct detection of pathogens may remove the need for indicators altogether (Gleeson and Gray, 1997). While these technologies have been used extensively to test water in standard environmental laboratories, they have never been performed on site in a remote area, onboard a mobile laboratory [84].

Conclusion

The presence of contaminants in water is a major concern for the Cree people. The CMM module of the AML was used successfully to monitor the microbiological quality of drinking water in and around Mistissini. Fecal contamination indicator such as total coliforms, *E. coli*, and enterococci, were targeted and detected on-site using MF or MPN methods. These bacteria were detected at least once in all drinking water sources, with varying distribution patterns, over a period of 30 days. Microbiological results from both methods suggest that selected lake or river water sources in the Mistissini area should not be directly used for drinking, as positive results for all fecal contamination indicators were obtained at a high frequency. Interestingly, traditional community perception about the best environmental water sources supported scientific data obtained in this study. In addition, it seems that the proper collection and storage of water limits drinking-related health risks associated with bacterial contaminants. This finding stresses the need for a longitudinal and time course experiment that would study the survival rate of bacterial indicator as well as of other waterborne pathogens in portable containers used by the Cree people. This study also underlines the importance of using multiple indicators while stressing the need for more research and development of innovative technologies in the field of fecal contamination monitoring. It also serves to reveal that on-site monitoring of environmental water is possible onboard the AML in First Nations communities and, as such, it could serve as a platform for novel technology testing and evaluating in remote areas.

Acknowledgements

This study was supported by grant PA-15586 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and by grant FCI-5251 from Canadian Foundation for Innovation (CFI). Jean-Luc Bernier and Andrée F. Maheux hold scholarships from the Nasivvik Center for Inuit Health and Changing Environment (Canadian Institutes of Health Research). Special thanks to Suzanne Gingras for her computational skills.

References

1. **Reiff, F. M., M. Roses, L. Venczel, R. Quick, and V. M. Witt.** 1996. Low-cost safe water for the world: a practical interim solution. *J Public Health Policy* **17**:389-408.
2. **Hutson, S. S., N. L. Barber, J. F. Kenny, K. S. Linsey, D. S. Lumia, and M. Maupin.** 2004. Estimated use of water in the United States in 2000. *U.S. Geological Survey* **1268**:46.
3. **Drangert, J. O.** 1993. Who cares about water? Household water development in Sukumaland, Tanzania. Linköping studies in Arts and Science.
4. **World Health Organization.** 2005. International meeting on the management of water quality in rural and remote communities. World Health Organization, Alice Springs.
5. **Wheatley, B., and S. Paradis.** 1995. Exposure of Canadian Aboriginal People to Methylmercury. *Water, Air, Soil Pollut* **80**:3-11.
6. **Furgal, C. M.** 1999. Addressing Northern decision making capacity: the case of health advisories and the Labrador Inuit. PhD Thesis. University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada.
7. **Blackstock, M.** 2001. Water: A First Nations' spiritual and ecological perspective. *B.C. Journal of Ecosystems and Management* **1**:54-66.
8. **Martin, D.** 2005. Quality of drinking water in Nunavik : How a changing climate affects disease. *Inuit Tapirit Kanatami Environmental Bulletin : Freshwater in Inuit Communities* **3**:13-15.
9. **Renshaw, M., M. Birley, D. Sang, and J. Silver.** 1998. A rapid health impact assessment of the Turkwel Gorge hydroelectric dam and proposed irrigation project. *Impact Assessment Project Appraisal* **16**:215-226.
10. **McNeill, W. H.** 1976. *Plagues and People*. Anchor Press-Press, New-York: 366 pages.
11. **Baggott, R., T. Brown, R. Hunt, and K. Jones.** 2004. The impact of overcrowding on health & education: a review of evidence and literature. Office of the Deputy Prime Minister, London: 45 pages.
12. **Epstein, P. R.** 2004. Climate change and public health: emerging infectious diseases. *Encyclopedia Energy* **1**:381-392.
13. **OECD.** 2005. *Bridge Over Troubled Waters :Linking Climate Change and Development* ISBN 92-64-01275-3.
14. **Parkinson, A., and J. Butler.** 2005. Potential impacts of climate change on infectious diseases in the Arctic. *Int J Circumpolar Health* **64**:478-486.
15. **Vitousek, P. M., H. A. Mooney, J. Lubchenco, and M. M. Melillo.** 1997. Human domination of Earth's ecosystems. *Science* **277**:494-499.
16. **Rosenberg, T., O. Kendall, J. Blanchard, S. Martel, C. Wakelin, and M. Fast.** 1997. Shigellosis on Indian reserves in Manitoba, Canada: its relationship to crowded housing, lack of running water, and inadequate sewage disposal. *Am J Public Health* **87**:1547-51.
17. **World Health Organization.** 2004. *Guidelines for drinking-water quality 3rd edition, vol. 1*. World Health Organization, Geneva: 494 pages.
18. **USEPA.** 2002. *List of contaminants & their mCLs: Potential health effects from ingestion of water* EPA 816-F-02-013.
19. **Dufour, A. P.** 1977. *Escherichia coli*: the fecal coliform, p. 48-58. *In* A. W. Halley and B. J. Dutka (ed.), *Bacterial indicators / health hazards associated with water*, vol. 273. ASTM International, Philadelphia.

20. **WHO.** 2004. Guidelines for drinking-water quality 3rd edition, vol. 1. World Health Organization, Geneva: pages.
21. **Leclerc, H., D. A. Mossel, S. C. Edberg, and C. B. Struijk.** 2001. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu Rev Microbiol* **55**:201-234.
22. **Gouvernement du Québec.** 2005. Loi sur la qualité de l'environnement : Règlement sur la qualité de l'eau potable. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. L.R.Q., c. Q-2, r.18.1.1.
23. **Bordner, R., and J. Winter.** 1978. Microbiological methods for monitoring the environment. EPA-600/8-78-017.
24. **USEPA.** 1997. Volunteer stream monitoring: A methods manual EPA 841-B-97-003.
25. **Environnement Canada.** http://meteo.ec.gc.ca/city/pages/qc-121_metric_f.html.
26. **Clesceri, L. S., A. E. Greenberg, and A. D. Eaton.** 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Arnold E. Greenberg ed. American Public Health Association, Washington, D. C.: 1325 pages pages.
27. **Messer, J. W., and A. P. Dufour.** 1998. A rapid, specific membrane filtration procedure for enumeration of enterococci in recreational water. *Appl Environ Microbiol* **64**:678-680.
28. **USEPA.** 2002. Method 1600: Enterococci in water by membrane filtration using membrane-*Enterococcus* indoxyl- β -D-glucoside agar (mEI).
29. **Pearson, K.** 1926. On the coefficient of racial likeness. *Biometrika* **18**:105-117.
30. **Cocker, D. R., 3rd, S. D. Shah, K. Johnson, J. W. Miller, and J. M. Norbeck.** 2004. Development and application of a mobile laboratory for measuring emissions from diesel engines. 1. Regulated gaseous emissions. *Environ Sci Technol* **38**:2182-2189.
31. **Dworzanski, J. P., W. H. McClennen, P. A. Cole, S. N. Thornton, H. L. C. Meuzelaar, N. S. Arnold, and A. P. Snyder.** 1997. Field-portable, automated pyrolysis-GC/IMS system for rapid biomarker detection in aerosols: a feasibility study. *Field Anal Chem Technol* **1**:295-305.
32. **Higgins, J. A., M. Cooper, L. Schroeder-Tucker, S. Black, D. Miller, J. S. Karns, E. Manthey, R. Breeze, and M. L. Perdue.** 2003. A field investigation of *Bacillus anthracis* contamination of U.S. Department of Agriculture and other Washington, D.C., buildings during the anthrax attack of October 2001. *Appl Environ Microbiol* **69**:593-599.
33. **MacNaughton, S. J., J. R. Stephen, A. D. Venosa, G. A. Davis, Y. J. Chang, and D. C. White.** 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl Environ Microbiol* **65**:3566-3574.
34. **Mohamed, A. D.** 2004. Design of national groundwater quality monitoring network in Egypt. *Environmental Monitoring and Assessment* **96**:99-118.
35. **Driver, F.** 2004. Imagining the tropics: views and visions of the tropical world. *Singapore J Trop Geog* **25**:1-17.
36. **Byappanahalli, M., M. Fowler, D. Shively, and R. Whitman.** 2003. Ubiquity and persistence of *Escherichia coli* in a Midwestern coastal stream. *Appl Environ Microbiol* **69**:4549-4555.
37. **Carrillo, M., E. Estrada, and T. C. Hazen.** 1985. Survival and enumeration of the fecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed. *Appl Environ Microbiol* **50**:468-476.
38. **Fujioka, R., C. Sian-Denton, M. Borja, J. Castro, and K. Morphew.** 1999. Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Guam's streams. *Appl*

- Microbiol Symp Suppl **85**:83S-89S.
39. **Fujioka, R. S., and M. N. Byappanahalli.** 2001. Microbial ecology controls the establishment of fecal bacteria in tropical soil environment, p. 273-283. *In* K. H. T. Matsuo, S. Takizawa, and H. Satoh (ed.), *Advances in water and wastewater treatment technology: molecular technology, nutrient removal, sludge reduction and environmental health*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
 40. **Solo-Gabriele, H. M., M. A. Wolfert, T. R. Desmarais, and C. J. Palmer.** 2000. Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Appl Environ Microbiol* **66**:230-237.
 41. **Whitman, R. L., and M. B. Nevers.** 2003. Foreshore sand as a source of *Escherichia coli* in nearshore water of a Lake Michigan beach. *Appl Environ Microbiol* **69**:5555-5562.
 42. **Byappanahalli, M. N.** 2000. Assessing the persistence and multiplication of fecal indicator bacteria in Hawaii's soil environment. Ph. D. thesis. University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii, USA.
 43. **Hardina, C. M., and R. S. Fujioka.** 1991. Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii's streams. *Environ Toxicol Water Qual* **6**:185-195.
 44. **Byappanahalli, M. N., R. L. Whitman, D. A. Shively, M. J. Sadowsky, and S. Ishii.** 2006. Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. *Environ Microbiol* **8**:504-13.
 45. **Griffin, D. W., K. A. Donaldson, J. H. Paul, and J. B. Rose.** 2003. Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin Microbiol Rev* **16**:129-143.
 46. **Jones, K.** 2001. *Campylobacters* in water, sewage and the environment. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* **30**:68S-79S.
 47. **Madore, M. S., J. B. Rose, C. P. Gerba, M. J. Arrowood, and C. R. Sterling.** 1987. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. *J Parasitol* **73**:702-5.
 48. **Malakoff, D.** 2002. Water quality. Microbiologists on the trail of polluting bacteria. *Science* **295**:2352-3.
 49. **Geldreich, E. E., H. D. Nash, D. J. Reasoner, and R. H. T. Taylor.** 1972. The necessity of controlling bacterial populations in potable waters: community water supply. *J. Am. Water Works Assoc.* **64**:596-602.
 50. **USEPA.** 2002. National water quality inventory 2000 report EPA-841-R-02-001.
 51. **Münster, U., E. Heikkinen, and J. Knulst.** 1998. Nutrient composition, microbial biomass and activity at the air-water interface of small boreal forest lakes. *Hydrobiologia* **363**:261-270.
 52. **Palmer, M. A., A. P. Covich, B. J. Finlay, J. Gibert, K. D. Hyde, R. K. Johnson, T. Kairesalo, P. S. Lake, C. R. Lovell, R. J. Naiman, C. Ricci, F. Sabater, and S. D.** 1997. Biodiversity and ecosystem processes in freshwater sediments. *Ambio*. **26**:571-577.
 53. **Muela, A., P. Santorum, I. Arana, J. M. Garcia-Bringas, and I. Barcina.** 1998. Discharge of disinfected wastewater in recipient aquatic systems: fate of allochthonous bacterial and autochthonous protozoa populations. *J Appl Microbiol* **85**:263-270.
 54. **Sibille, I., T. Sime-Ngando, L. Mathieu, and J. C. Block.** 1998. Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* **64**:197-202.
 55. **Medema, G., M. Bahar, and F. Schets.** 1997. Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, faecal enterococci, and *Clostridium perfringens* in riverwater: Influence

- of temperature and autochthonous microorganisms. *Wat Sci Technol* **35**:249-252.
56. **Neu, T. R., and J. R. Lawrence.** 1997. Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microb. Ecol.* **24**:11-25.
 57. **Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* **41**:435-464.
 58. **Davies, C. M., J. A. Long, M. Donald, and N. J. Ashbolt.** 1995. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol* **61**:1888-1896.
 59. **Reed, R. H.** 2004. The inactivation of microbes by sunlight: solar disinfection as a water treatment process. *Adv Appl Microbiol* **54**:333-65.
 60. **Fujioka, R. S., H. H. Hashimoto, E. B. Siwak, and R. H. F. Young.** 1981. Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Appl Environ Microbiol* **41**:690-696.
 61. **Patwardhan, A. R.** 1990. *Our Water our Life*. Delhi: Council for Advancement of People's Action and Rural Technology. 32 pages.
 62. **Reed, R. H., S. K. Mani, and V. Meyer.** 2000. Solar photo-oxidative disinfection of drinking water: preliminary field observations. *Lett Appl Microbiol* **30**:432-436.
 63. **Sinton, L. W., C. H. Hall, P. A. Lynch, and R. J. Davies-Colley.** 2002. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl Environ Microbiol* **68**:1122-31.
 64. **Colwell, R. R., A. Huq, M. S. Islam, K. M. Aziz, M. Yunus, N. H. Khan, A. Mahmud, R. B. Sack, G. B. Nair, J. Chakraborty, D. A. Sack, and E. Russek-Cohen.** 2003. Reduction of cholera in Bangladeshi villages by simple filtration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:1051-1055.
 65. **Iijima, Y., M. Karama, J. O. Oundo, and T. Honda.** 2001. Prevention of bacterial diarrhea by pasteurization of drinking water in Kenya. *Microbiol Immunol* **45**:413-416.
 66. **Conroy, R. M., M. Elmore-Meegan, T. Joyce, K. G. McGuigan, and J. Barnes.** 1996. Solar disinfection of drinking water and diarrhoea in Maasai children: a controlled field trial. *Lancet* **348**:1695-1697.
 67. **Oates, P. M., P. Shanahan, and M. F. Polz.** 2003. Solar disinfection (SODIS): simulation of solar radiation for global assessment and application for point-of-use water treatment in Haiti. *Water Res* **37**:47-54.
 68. **Roberts, L., Y. Chartier, O. Chartier, G. Malenga, M. Toole, and H. Rodka.** 2001. Keeping clean water clean in a Malawi refugee camp: a randomized intervention trial. *Bull World Health Org* **79**:280-287.
 69. **Wright, J., S. Gundry, and R. Conroy.** 2004. Household drinking water in developing countries: a systematic review of microbiological contamination between source and point-of-use. *Trop Med Int Health* **9**:106-117.
 70. **Acra, A., M. Jurdi, H. Mu'Allem, Y. Karahagopian, and Z. Raffoul.** 1990. *Water disinfection by solar radiation*. International Development Research Centre, Ottawa, Canada: 83 pages.
 71. **Carter, M. J.** 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol* **98**:1354-1380.
 72. **Kehoe, S. C., T. M. Joyce, P. Ibrahim, J. B. Gillespie, R. A. Shahar, and K. G. McGuigan.** 2001. Effect of agitation, turbidity, aluminium foil reflectors and container

- volume on the inactivation efficiency of batch-process solar disinfectors. *Water Res* **35**:1061-1065.
73. **LeChevallier, M. W., N. J. Welch, and D. B. Smith.** 1996. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Appl Environ Microbiol* **62**:2201-2211.
 74. **Struck, P. H.** 1988. The relationship between sediment and fecal coliform levels in a Puget Sound estuary. *J Envir Health* **50**:403-407.
 75. **Yamamoto, H., M. Sugiura, S. Kusunoki, T. Ezaki, M. Ikedo, and E. Yabuuchi.** 1992. Factors stimulating propagation of *Legionellae* in cooling tower water. *Appl Environ Microbiol* **58**:1394-1397.
 76. **Ashbolt, N. J.** 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* **198**:229-238.
 77. **Long, S. C., C. P. Arango, and J. D. Plummer.** 2005. An optimized enumeration method for sorbitol-fermenting bifidobacteria in water samples. *Can J Microbiol* **51**:413-421.
 78. **Payment, P., J. Siemiatycki, L. Richardson, G. Renaud, E. Franco, and M. Prévost.** 1997. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *Int. J. Environ. Health Res.* **7**:5-31.
 79. **Binsztein, N., M. C. Costagliola, M. Pichel, V. Jurquiza, F. C. Ramirez, R. Akselman, M. Vacchino, A. Huq, and R. Colwell.** 2004. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Appl Environ Microbiol* **70**:7481-6.
 80. **Lleo, M. M., B. Bonato, M. C. Tafi, C. Signoretto, M. Boaretti, and P. Canepari.** 2001. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J Appl Microbiol* **91**:1095-1102.
 81. **Chauret, C., N. Armstrong, J. Fisher, R. Sharma, S. Springthorpe, and S. Sattar.** 1995. Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. *J Am Water Works Assoc* **87**:76-84.
 82. **Lemarchand, K., and P. Lebaron.** 2003. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. *FEMS Microbiol Lett* **218**:203-209.
 83. **Sharma, S., P. Sachdeva, and J. S. Viridi.** 2003. Emerging waterborne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**:424-8.
 84. **Rompere, A., P. Servais, J. Baudart, M. R. de-Roubin, and P. Laurent.** 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J Microbiol Methods* **49**:31-54.

Tables and figures

Tableau 6 : Microbiological analysis of fecal indicator microorganisms in raw drinking water

Sampling sites (map ID)	Source type	Sampling events (MPN)	Colilert® ^a						Enterolert™ ^a			Sampling events (MF)	mEI ^a		
			Total coliforms			<i>Escherichia coli</i>			Enterococci				Enterococci		
			range	\bar{X}	<i>s</i>	range	\bar{X}	<i>s</i>	range	\bar{X}	<i>s</i>		range	\bar{X}	<i>s</i>
Km 357 (A)	Lake	6	62.4 - >200.5	>135.5	50.5	<1 - 6.4	<1.4	2.2	<1 - 200.5	<35.7	17.7	3	0 - 250	84	118
Km 357 camp (B)	Lake	6	62.4 - >200.5	>165.7	48.8	<1 - 2	<0.3	0.8	<1 - 4.2	<1.2	1.3	3	1 - 4	2	1
S. R. R. launching dock (D)	Lake	3	47.8 - 200.5	137.8	65.3	<1 - 1	<0.3	0.5	<1 - 9.9	<4.0	3.9	-	^b	N/A	-
S. R. R. Camp (F)	Lake	3	200.5 - >200.5	>200.5	0	2 - 34.4	14	10	<1 - 11	<6	4	-	^b	N/A	-
Wapachee camp (I)	Lake	10	13.7 - 200.5	58.3	50.8	<1 - 27.1	<2.7	6.3	<1 - 17.8	<2.9	4.5	6	0 - 7	3	2
Perche River (K)	Lake	9	3.1 - >200.5	>97.5	83.6	<1 - 1	<0.1	0.3	<1 - 4.2	<1.7	1.3	5	0 - 28	6	10
North Revelation River (C)	River	3	200.5 - >200.5	>200.5	0	13.7 - 23.8	18.4	2.9	<1 - 1	<0.3	0.5	1	1	1	0
South Revelation River (E)	River	4	78.5 - >200.5	>169.0	50.9	2 - 38.4	14	10	<1 - 2	<0.5	0.9	1	0	0	0
Chalifour Camping (G)	River	6	144.5 - >200.5	>191.2	20.8	<1 - 2	<0.5	0.8	<1 - 32.4	<11.6	9.4	3	0 - 72	24	33
Chalifour River Bridge (H)	River	5	200.5 - >200.5	>200.5	0	20.7 - 78.2	46.0	7.3	<1 - 19.2	<4.2	6.3	3	15 - 100	45	38
Perche River Bridge (J)	River	10	144.5 - >200.5	>184.3	20.6	6.5 - 25	18	7	<1 - 2	<0.5	0.7	6	1 - 43	11	15
Icon River (L)	River	9	200.5 - >200.5	>200.5	0	4.2 - 19.2	7.9	3.9	<1 - 2	<0.3	0.7	4	1 - 9	3	3

^a Results are in Colony Forming Units (CFU) per 100 mL

^b Not performed

Tableau 7: Survey of drinking water stored in portable containers

House	Colilert®		Enterolert™		Map site ID	Filtration device	Container cleaning frequency	Domestic plastic container (type, access, opacity, location)	Container filling frequency
	Total coliform	<i>Escherichia coli</i>	Enterococci						
1	200.5	<1	<1	I	N/A ^d	N/A	plastic, closed, N/A, N/A	N/A	
2	-	-	-	-	N/A	N/A	plastic, closed, N/A, N/A	N/A	
3	19.2	<1	<1	I	N/A	N/A	plastic, closed, transparent, N/A	twice a year	
4	3.1	<1	<1	I	N/A	N/A	plastic, closed, transparent, N/A	N/A	
5	200.5	<1	<1	B	N/A	N/A	plastic, closed, N/A, N/A	once a month	
6	-	-	-	I	cotton cloth	N/A	plastic, closed, opaque, N/A	when empty	
7	5.3	<1	<1	I	cotton cloth	twice a month	plastic, closed, opaque, outside	twice a month	
8	23.8	<1	1	I	cotton cloth	rinsing with water only	plastic, closed, opaque, inside	twice a month	
9	-	-	-	I	cotton cloth	N/A	plastic, closed, opaque, outside	every three weeks	
10	<1	<1	1	-	cotton cloth	every week	plastic, closed, transparent, inside	once a week	
11	nmw ^c	nmw	nmw	I	cotton cloth	every week	plastic, closed, opaque, outside	N/A	
12	200.5	1	<1	B	cotton cloth	every week	plastic, closed, opaque, inside	once a week	
13	13.7	<1	<1	I	cotton cloth	every week	plastic, closed, opaque, outside	once a week	
14	nmw	nmw	nmw	I	cotton cloth	N/A	plastic, closed, opaque, inside	twice a month	
15	nmw	nmw	nmw	I	cotton cloth	rinsing with water only	plastic, closed, opaque, outside	twice a month	
16	>200.5	<1	<1	K	canvas or cotton cloth	twice a month ^b	plastic, closed, opaque, inside	once a week	
17	9.9	<1	<1	B	cotton cloth	N/A	plastic, closed, transparent, outside	twice a week	
18	>200.5	6.4	2	I	cotton cloth	when empty, each time	plastic, closed opaque, inside	once a week	
19	6.4	<1	<1	-	cotton cloth	when empty, each time	plastic, closed, opaque, outside	three times per month	
20	1	<1	3.1	I	cotton cloth	Once a month	plastic, closed, opaque, outside	once a month	
21	>200.5	<1	<1	B	cotton cloth	Rinse with water each time	plastic, closed, opaque, outside	twice per week	
22	-	-	-	I	cotton cloth	rinsing with water only	plastic, closed, opaque, inside	once a month	
23	5.3	<1	<1	I	cotton cloth	rinsing with water only	plastic, closed, opaque, outside	twice a month	
24	8.7	<1	<1	I	cotton cloth	Once a week	plastic, closed, transparent, inside	twice a week	

^a Colilert®, Enterolert™ are measured in colony forming units (CFU) / 100 mL.

^b Rinsing with sodium hypochlorite (bleach), let rest, then rinse with water.

^c nmw: no more water.

^d N/A: information is not available

Results in grey indicate water samples fit for drinking according to US EPA guidelines

Tableau 8: Percentage of environmental sites samples contaminated according to U.S. Environmental Protection Agency (EPA) current drinking water standards

Sampling sites	Source type	Sampling events (MPN)	Colilert®		Enterolert™	Sampling events (MF)	mEI
			Total coliforms	<i>Escherichia coli</i>	Enterococci		Enterococci
Km 357	Lake	6	100%	33,3%	83,3%	3	66,7%
Km 357 camp	Lake	6	100%	16,7%	66,7%	3	100%
S. R. R. Launching dock	Lake	3	100%	33,3%	66,7%	-	N/T ^b
S. R. R. Camp	Lake	3	100%	100%	66,7%	-	N/T
Wapachee camp	Lake	10	100%	10%	60%	6	83,3%
Perche River	Lake	9	77,8%	11,1%	77,8%	5	60%
North Revelation River	River	3	100%	100%	33,3%	1	100%
South Revelation River	River	4	100%	100%	25%	1	0%
Chalifour Camping	River	6	100%	33,3%	83,3%	3	66,7%
Chalifour River Bridge	River	5	100%	100%	40%	3	100%
Perche River Bridge	River	10	100%	100%	40%	6	100%
Icon River	River	9	100%	100%	22,2%	4	100%

^a <http://www.epa.gov/safewater/mcl.html>

^b N/T: these sites were not tested by this method

Tableau 9: Presence of total coliforms, *Escherichia coli*, and enterococci counts depending on environmental water source type and detection method

Tests	Colilert®		Enterolert™	mEI
	Total	<i>Escherichia</i>	Enterococci	Enterococci
Lake	132.6 ± 47.0	3.1 ± 4.6	8.5 ± 11.4	16.0 ± 30.9
River	191.0 ± 29.7	17.5 ± 13.1	2.9 ± 1.5	14.1 ± 17.8
Ratio (Lake/River)	0.7	0.2	2.9	1.1

Figure 5: Atlantis Mobile Laboratory ready to go and the interior design of its classic and molecular (CMM) module



www.atlantis.ulaval.ca

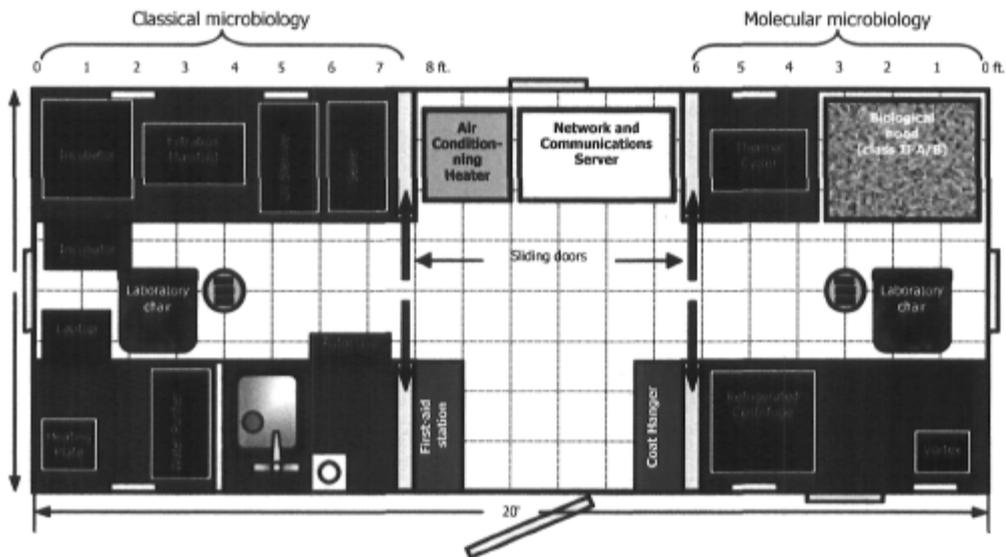
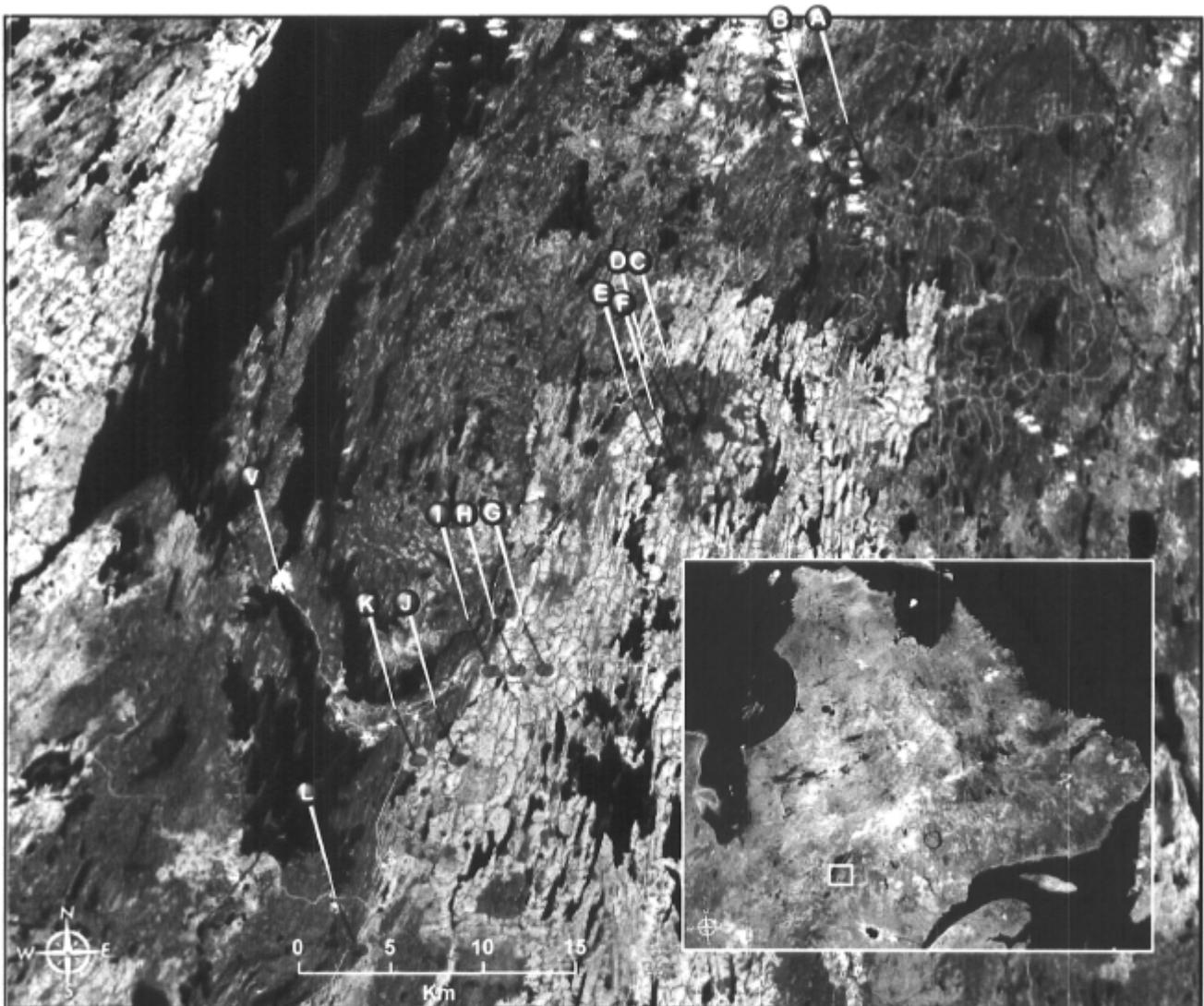


Figure 6: Topology map of the Mistissini region showing the southern tip of Lake Mistassini and sampled environmental drinking water sites



Note: Environmental sites used as drinking water sources: A-km357 (lake); B-km357 camp (lake); C-North revelation river (river); D-South revelation river launching dock (lake); E-South revelation river (river); F-South revelation river camp (lake); G-Chalifour camping (river); H-Chalifour river bridge (river); I-Wapachee camp (lake); J-Perche River bridge (river); K-Perche river (lake); L-Icon (river)

Chapitre III

Transfert de méthodes de détection moléculaire

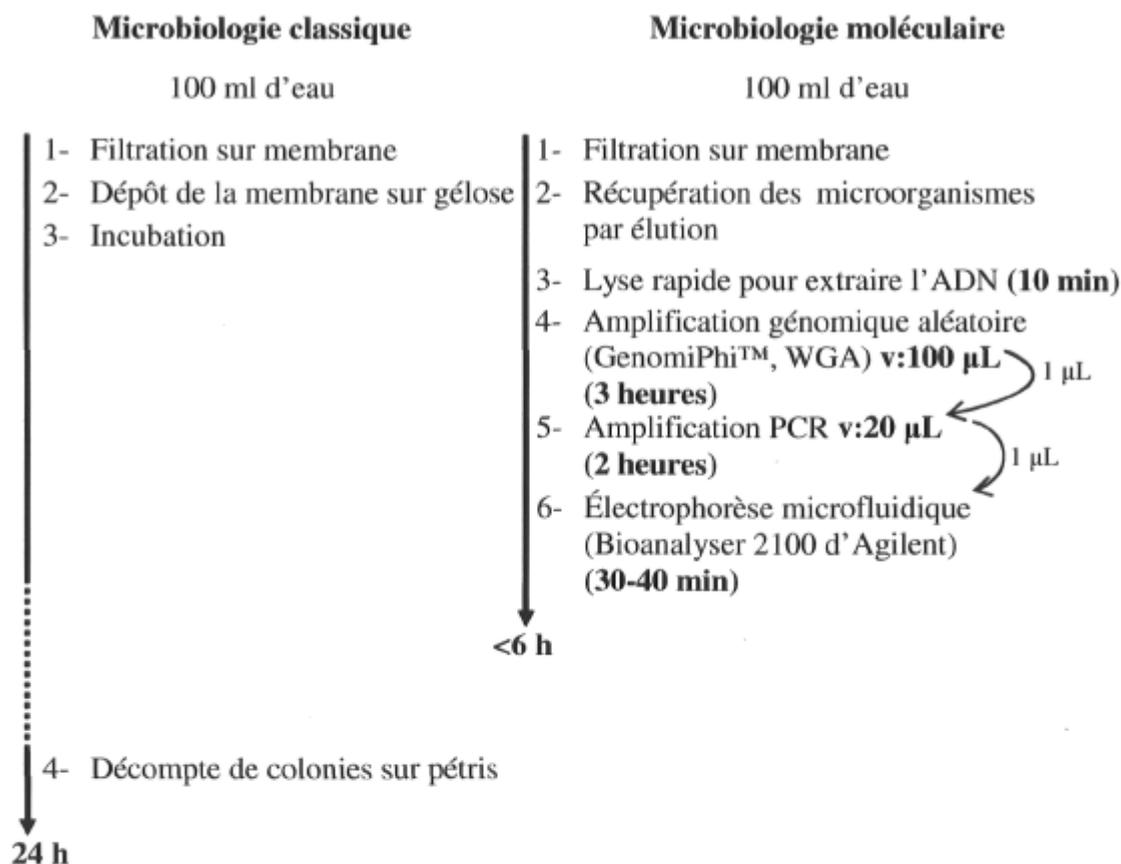
3.1 Introduction

3.1.1 Essais de détection moléculaire ciblant *E. coli* et les entérocoques

Le Centre de recherche en infectiologie (CRI) bénéficie d'une expertise de renommée internationale en ce qui a trait au développement de tests de diagnostics moléculaires [126-129]. Les connaissances et technologies disponibles au CRI ont été transposées aux problématiques reliées au diagnostic environnemental, étendant ainsi ses compétences à d'autres champs d'investigation reliés à la santé humaine.

Les standards de l'US EPA en matière de qualité microbiologique de l'eau ont servi de lignes directrices lors du développement de méthodes de détection moléculaire ciblant *E. coli* et les entérocoques en raison de leur stringence et de leur universalité comparativement à celles du Québec et du Canada (Tableau 4). En effet, les nombreuses missions à l'étranger prévues pour le LMA ainsi que la quantité et la disponibilité des informations fournies par l'US EPA favorisent l'utilisation de leurs standards. Les protocoles de recherche utilisés à bord du MMCM ont aussi été élaborés selon les standards du Système Qualité en vigueur au CRI. La transposition de cette philosophie/structure de travail assure le bon déroulement des activités scientifiques à bord du MMCM, favorise la reproductibilité des résultats et offre ainsi à la communauté visitée une analyse rigoureuse des enjeux préoccupants qui font l'objet même de la visite. Ma collègue Andrée F. Maheux est premier auteur d'un article décrivant les détails d'une méthode moléculaire permettant la détection rapide, sensible et spécifique d'*E. coli* à partir d'échantillon d'eau douce et qui a été soumis pour publication sous le titre de *Rapid DNA-based Assay for Detection of Escherichia coli from Drinking Water Samples* [124]. Les principales étapes de cette méthode de détection sont schématisées à la figure 7. Elles y sont aussi comparées au protocole général de détection en microbiologie classique.

Figure 7 : Schéma organisationnel pour la réalisation des méthodes de détection de microbiologie classique et moléculaire



Les deux méthodes de microbiologie moléculaire développées au CRI et qui permettent la détection respective de *E. coli* et des entérocoques sont réalisées de la même manière. Ces méthodes ont été développées et testées au CRI. Des échantillons d'eau artificiellement contaminés ont été utilisés pour les fins du développement. De l'embouteillée a d'abord été filtrée sur des membranes de porosité de 0,22 µm (Millipore Corporation, Billerica, MN) afin d'assurer l'absence des bactéries. Des échantillons de cette eau filtrée sont aseptiquement inoculés avec des volumes précis de cultures bactériennes liquides et quantifiées par densité optique, obtenues tel que décrit en détails par Maheux et collègues [124]. Des fractions de 100 mL d'eau inoculée sont ensuite filtrés sur des membranes GN-6 de Milipore (diamètre de 47-mm, porosité de 0.45 mm) à l'aide de la rampe de filtration de Millipore (Manifold, Millipore Corporation, Billerica, MN). Le filtre d'une de ces fractions

de 100 mL est retiré de la rampe de filtration et est introduit dans un tube vissé de 15 mL (Sarstedt, Inc., Newton, NC). Le contenu de ce filtre sera utilisé pour la suite de la méthode de détection moléculaire dont le protocole est illustré à la figure 7.

La première étape du protocole de récupération des microorganismes consiste à éluer les bactéries retenues sur les membranes filtrantes en utilisant un tampon physiologique et un mécanisme de brassage mécanique rapide (vortex). L'éluat est ensuite transféré dans un tube contenant des billes de verre, (trousse d'extraction d'ADN d'IDI, Infectio Diagnostics Inc. dorénavant BD-GeneOhm, Sainte-Foy, Québec, Canada). Le tube est ensuite centrifugé 16 000 X g durant 5 minutes à la température de la pièce. Le surnageant est jeté et le tube contenant le culot de cellules est utilisé pour l'étape d'amplification WGA à l'aide de la trousse GenomiPhiTM fournit par GE Healthcare (Baie d'Urfé, Québec, Canada). Le culot est ensuite suspendu dans 40 µL de GenomiPhiTM *Sample Buffer* et le tube est soumis au protocole de lyse rapide (10 minutes), développé pour IDI tel que décrit par Ke et collègues [129]. Suite à la lyse cellulaire, 50 µL de GenomiPhiTM *Reaction Buffer* et 4 µL de GenomiPhiTM *Enzyme Mix* sont ajoutés au tube et ce dernier est incubé à 30°C durant 3 heures pour permettre l'amplification non spécifique de tous les ADN présents (Figure 7).

Un échantillon de 100 mL d'eau non-inoculée est aussi filtrée afin d'assurer l'absence des bactéries cibles dans l'eau ainsi que dans tous les réactifs utilisés pour la réalisation des méthodes. L'éluat de cet échantillon contrôle est testé par amplification WGA et sert ainsi de contrôle négatif de la procédure de filtration. Un (1) µL de chacune des réactions WGA est ensuite utilisé comme spécimen cible pour la réaction d'amplification par PCR, spécifique à *E. coli* ou aux entérocoques.

Les réactions PCR sont réalisées tel que décrit par Maheux et collègues [124]. Un contrôle interne (m13pSL3) est utilisé dans ces essais afin de vérifier l'efficacité d'amplification et ainsi qu'à assurer l'absence d'inhibition des réactions PCR. La composition et l'utilisation de ce contrôle interne a déjà été décrit par notre groupe de recherche [130]. Après l'assemblage des réactifs, les tubes de réactions PCR sont soumis au programme de thermocyclage approprié et réalisé dans un PTC-200 DNA Engine Thermocycler (MJ

Research Inc., Watertown, MA, États-Unis). Les produits d'amplification sont finalement analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% tel que décrit par Martineau et collègues [131], procédure qui requiert environ 1 heure.

Le développement de ces méthodes au sein du CRI a requis l'utilisation de mesures de précaution strictes afin d'éliminer le risque de contamination croisée entre les réactions: 1) l'assemblage des réactifs pré- et post- PCR a été réalisé dans des salles à part sous des hottes biologiques équipées de filtres HEPA , 2) des embouts résistants aux aérosols ont été utilisés et 3) des réactions contrôles sans ADNg ont été effectuées de routine pour confirmer l'absence de contamination croisée.

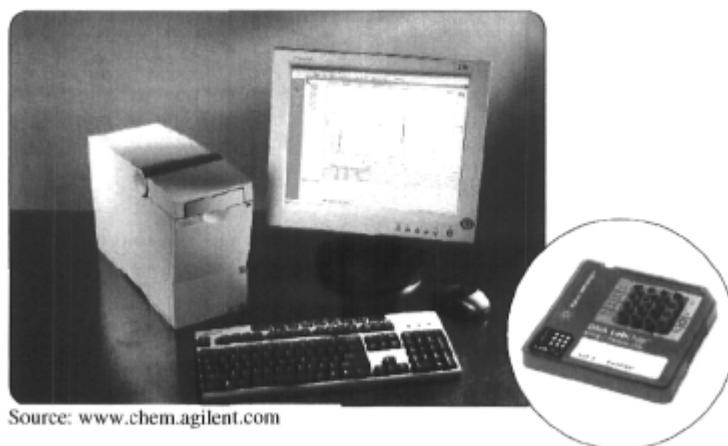
3.1.2 Problématique du transfert technologique

Le transfert des deux essais moléculaires a requis un travail d'adaptation à l'environnement du MMCM étant donné des différences matérielles importantes et les contraintes d'espaces de travail retrouvées sur le MMCM en comparaison avec le laboratoire du CRI. Il est à noter que certains des appareils de biologie moléculaire utilisés à bord du MMCM sont différents de ceux employés au CRI, élément qui demeure à être corrigé de manière urgente.

Le thermocycleur utilisé à bord du MMCM est le T3 de Biometra (Whatman, New Jersey, États-Unis) alors que ceux utilisés au CRI sont des PTC-200 de MJ Research (Bio-Rad, Californie, États-Unis). Contrairement aux PTC-200, le T3 de Biometra peut accueillir des tubes de 2 différents volumes: les 0.2 mL et les 0.5 mL. Il est primordial d'utiliser les plus petits puits pour l'exécution des réactions PCR lorsque celles-ci sont réalisées dans des tubes de 0.2 mL. Les gros puits laissent un mince espace d'air entre la paroi du tube et le rebord du puits et ce volume d'air est suffisant pour isoler le tube et empêcher un contact thermique homogène et donc efficace.

De plus, l'analyse des produits d'amplification PCR est effectuée différemment sur les 2 laboratoires. Au CRI, les produits d'amplification, ou amplicons, sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Les gels sont ensuite photographiés avec un appareil digital à rayonnement UV (AlphaImager[®], AlphaInnovatech, Californie, États-Unis). Cette méthode n'est cependant pas envisageable pour le MMCM étant donné des contraintes d'espaces et les propriétés mutagènes reconnus du bromure d'éthidium. À bord du MMCM, les produits d'amplifications sont analysés par une méthode d'électrophorèse microfluidique grâce à l'appareil Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Californie, États-Unis) (Figure 7).

Figure 8 : Appareil Bioanalyzer 2100 d'Agilent ainsi que la puce électrophorétique à ADN servant à l'analyse de fragments d'ADN.



Source: www.chem.agilent.com

Le Bioanalyzer 2100 d'Agilent est un appareil qui permet l'analyse des produits d'amplification PCR par électrophorèse microfluidique. Cette technologie se base sur la migration des produits d'amplification au travers d'un gel injecté manuellement dans des micro-canaux, ou capillaires. Les échantillons d'ADN issus des réactions d'amplification par PCR sont préalablement déposés dans les puits appropriés de la puce électrophorétique (Figure 8) et cette dernière est insérée dans la chambre électrophorétique de l'appareil. L'analyse d'une puce requiert 30-40 minutes, ce qui est un peu plus court que l'électrophorèse sur gel d'agarose pour moins de 13 échantillons. En effet, la puce compte 12 puits dans lesquels sont déposés les échantillons et l'appareil ne peut analyser qu'une puce à la fois. Cet appareil d'Agilent produit ensuite un aperçu digital des fragments amplifiés dans chaque réaction, en transmettant un électrophorégramme à l'écran de l'ordinateur. Ceci permet d'obtenir une représentation électronique des gels d'électrophorèse sans le bruit de fond, tout en fournissant des données de quantification relatives à l'amplification. Des expériences non publiées ont cependant démontrées l'incompatibilité de cette technologie avec des réactifs PCR comprenant des détergents.

Les deux essais PCR ciblant *E. coli* et les entérocoques avaient été initialement développés en utilisant un tampon de réaction dont la recette de base est fourni par la compagnie

Promega. Ce tampon de réaction qui contient 1,0% de Triton[®] X-100 (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n), un surfactant anionique. Ce composé réduit considérablement la tension de surface du gel se trouvant dans les micro-canaux empêchant ainsi l'analyse des produits d'amplification par électrophorèse microfluidique. Étant donné l'utilisation du Bioanalyzer 2100 d'Agilent à bord du MMCM, les essais PCR ont dû être adaptés afin d'éviter la présence de détergent dans les micro-canaux.

3.2 Protocoles utilisés et résultats obtenus

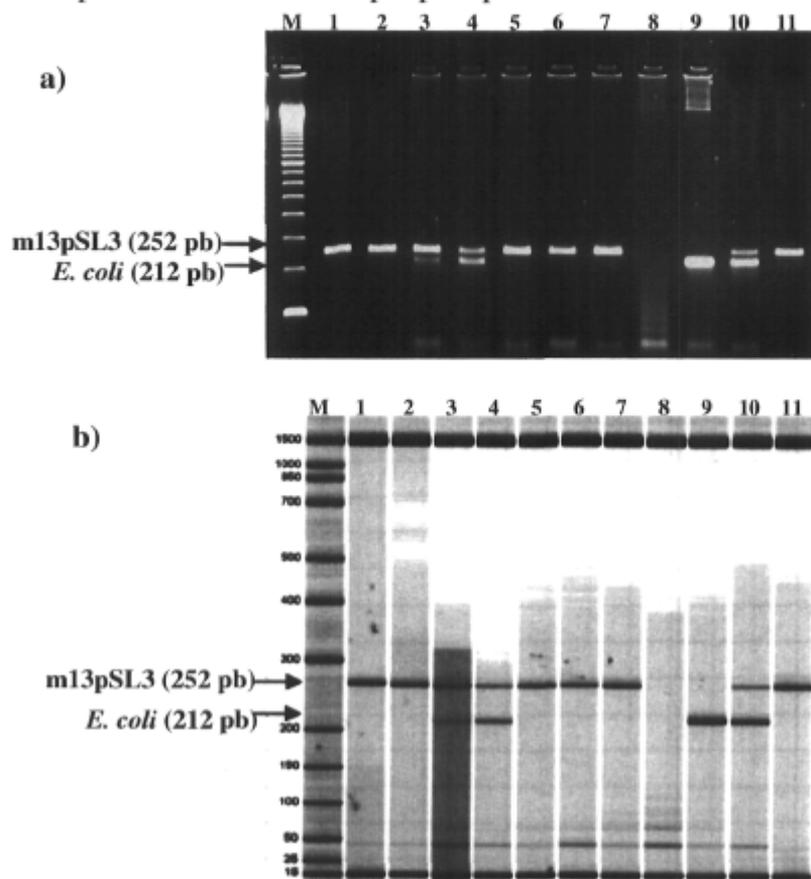
3.2.1 Optimisation du protocole d'amplification par PCR

3.2.1.1 Purification des produits d'amplification

La précipitation à l'éthanol a été la première technique testée pour tenter d'éliminer le détergent de la solution réactionnelle d'amplification PCR. Cette technique permet en fait de purifier l'ADN à partir d'une solution hétérogène. Le protocole consiste d'abord à ajouter 40 µl d'eau stérile dans le tube ayant servi à faire la réaction PCR. Vingt (20) µl d'acétate d'ammonium (CH₃COO[NH₄]₂) 7,5 M y sont ensuite ajoutés puis la solution est rapidement mélangée à l'aide du « vortex genie[®] II » à vitesse 3. Deux-cent (200) µl d'éthanol 95% conservé à -20°C sont ajoutés dans le tube avant que ce dernier soit de nouveau mélangé rapidement au vortex à vitesse 3. Le tube est ensuite centrifugé à 4°C et pendant 10 minutes à 9 500 x g (rcf) en prenant soin de pointer la penture du capuchon du tube vers l'extérieur du rotor de l'appareil. Le tube est ensuite sorti délicatement de la centrifugeuse et le surnageant est versé sur un papier absorbant en prenant soin de ne pas décrocher le culot. Cent (100) µl d'éthanol 70% sont ensuite ajoutés au tube et ce dernier est de nouveau centrifugé à température de la pièce à 12000 RPM pendant 2 minutes en prenant encore soin de pointer de nouveau la penture du capuchon du tube vers l'extérieur. Le tube est ensuite sorti délicatement de la centrifugeuse et le surnageant versé sur un papier absorbant en portant une attention particulière pour ne pas détacher le culot. Le tube est alors laissé à sécher en position inversée sur un papier absorbant pendant 15 minutes. Le culot est alors resuspendu dans 20 µl de TE1X. Un (1) µL de cette solution d'ADN purifié est utilisé pour l'analyse en électrophorèse microfluidique (Figure 7).

L'essai de détection d'*E. coli* tel que décrit dans l'article de Maheux et collègues [124] a été tenté en ajoutant ce protocole de purification de l'ADN avant l'électrophorèse microfluidique. Comme le démontre la figure 9, cette technique permet l'analyse des produits d'amplification sur le Bioanalyzer 2100 d'Agilent. Cette adaptation méthodologique a été utilisée à bord de MMCM durant l'étude *Nituuchischaayihitaa* *aschii* au cours de l'été 2005. La purification des produits PCR par cette technique allonge cependant le temps d'analyse d'une à deux heures, dépendamment du nombre d'échantillons à analyser, et s'avère à être fastidieuse en raison du nombre d'étapes à réaliser, augmentant ainsi la possibilité d'erreurs pouvant être commises.

Figure 9 : Analyse des produits d'amplification WGA-PCR par électrophorèse suite à la purification de l'ADN par précipitation à l'éthanol



a) électrophorèse sur gel d'agarose 2%, migration à 170 volts pendant 40 minutes; **b)** électrophorèse microfluidique avec le Bioanalyzer 2100 et analyse sur gel digital. Ces produits d'amplification ont été obtenus par WGA-PCR utilisant le tampon et l'enzyme de Promega suite à la réalisation de la méthode de détection tel que décrit par Maheux et collègues [124]. Les produits ont ensuite été purifiés par la technique de précipitation à l'éthanol décrite plus haut. Puits: **M**, échelle de poids moléculaire de 100 paires de bases ; **1**, 0 copie d'ADNg d'*E. coli* (contrôle négatif de salle PCR); **2**, 0 UFC d'*E. coli* (contrôle négatif #1 de la salle spécimen) ; **3**, 10 UFC d'*E. coli*; **4**, 2 UFC d'*E. coli*; **5**, 1 UFC d'*E. coli*; **6**, 0.5 UFC d'*E. coli*; **7**, 0 UFC d'*E. coli* (contrôle négatif de filtration); **8**, 0 copies ADNg d'*E. coli* (contrôle négatif de WGA amplifié au PCR) ; **9**, 10 copies ADNg d'*E. coli* (contrôle positif de WGA amplifié au PCR) ; **10**, 10 copies ADNg d'*E. coli* (contrôle positif de PCR); **11**, 0 copies d'ADNg d'*E. coli* (contrôle négatif #3 de salle spécimen); les hauteurs des différents produits d'amplification sont aussi indiquées.

3.2.1.2 Criblage de différentes formulation pour l'amplification PCR

La longueur et la quantité des manipulations requises pour la technique de précipitation à l'éthanol rendent les méthodes de détection moléculaire vulnérables aux contaminations et peuvent réduire leur sensibilité. Les efforts d'adaptation de l'étape d'amplification PCR ont ainsi été poursuivis au retour de la mission *Nituuchischaayihitaaau aschii*. Un criblage a premièrement été réalisé afin de comparer le potentiel de différents tampons et enzymes PCR ne contenant pas de détergent. Le tableau 10 présente une comparaison de la performance de l'essai PCR ciblant *E. coli* réalisé en utilisant différents tampons et enzymes ainsi qu'à identifier clairement le potentiel de chaque combinaison. Toutes les réactions PCR ont été réalisées avec de l'ADN génomique (ADNg), en guise de spécimens cibles, purifié tel que décrit par Ke et collègues [129]. Les solutions d'ADNg d'*E. coli* ATCC 11775 (CCRI 467) et d'*Enterococcus faecalis* ATCC 19433 (CCRI 95) à 10 ng/ μ L ont été diluées en série sous la hotte biologique afin d'obtenir un gradient de concentrations entre 100 et 1 copies de génomes/ μ L.

Le tableau 10 regroupe les résultats des expériences d'évaluation de la performance d'essais PCR utilisant des réactifs sans détergent, en comparaison avec l'essai PCR tel que décrit par Maheux et collègues [124]. Afin d'offrir une base de comparaison entre les séries de réactions obtenues par les différentes combinaisons de réactifs PCR, la composition des tampons réactionnels a été ajustée aux concentrations de BSA et de $MgCl_2$ retrouvées dans le tampon utilisé pour le développement des essais PCR, celui de Promega. Il est primordial de se rappeler que le tampon de réaction de la compagnie Proméga ne peut être utilisé pour les essais optimisés étant donné sa composition en Triton[®] X-100.

Tableau 10 : Criblage comparatif de la performance de différents essais PCR dont les produits d'amplification peuvent être analysés sur le Bioanalyzer 2100 d'Agilent

Tampons PCR	Polymérase à ADN de <i>Taq</i>				
	Promega	Roche	BD	Invitrogen	NEB
Promega	+++	+	+	+	+++
Roche	+	+	N/A ^a	N/A	+
NEB	++	+	N/A	N/A	+++
Fait maison	+	-	N/A	N/A	+

Légende : ^a N'a pas été réalisé

+++ Essais PCR donnant des résultats presque aussi performants que l'essai standardisé au CRI (Tampon Promega et enzyme *Taq* Promega) en termes de sensibilité (5 copies d'ADN génomique, 3 fois sur 3) et qui amplifient simultanément le contrôle interne (m13pSL3)

++ Essais PCR donnant des résultats moins probants que l'essai standard (sensibilité à 5 copies de génomes 1 fois sur 3, amplification de bandes non-spécifiques, produits d'amplification plus faible à l'électrophorèse)

+

Essais PCR très peu probants : amplification 1 fois sur 2, très faible amplification, beaucoup de dimères d'amorces ou encore aucune amplification du contrôle interne

-

Aucun essai d'amplification réussi avec cette combinaison de tampon de réaction et d'enzyme *Taq*

Nom des enzymes *Taq* utilisées

Promega « *Taq* DNA polymerase »

Roche « *Taq* DNA polymerase »

Invitrogen « Platinum *Taq* DNA Polymerase »

BD « Titanium *Taq* Dna Polymerase » du Advantage 2 PCR kit de BD, division CLONTECH

NEB « *Taq* DNA polymerase »

Composition finale des tampons de réaction PCR utilisés (1X)

Promega 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl et 0.1% Triton® X-100, pH 9.0 (25°C), 2.5mM de MgCl₂ et 3.33 mg/mL d'albumine de sérum bovin (*bovine serum albumin*, BSA)

Roche 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3 (20°C), 2.5 mM de MgCl₂ et 3.33 mg/mL de BSA

NEB 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3 (25°C), 2.5 mM de MgCl₂ et 3.33 mg/mL de BSA

Maison 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3 (25°C), 2.5 mM de MgCl₂ et 3.33 mg/mL de BSA

Parmi ces essais PCR utilisant des réactifs sans détergent, les combinaisons permettant les réactions les plus sensibles et reproductibles, en comparaison au standard (réactifs de Promega), ont été celles réalisées avec les produits de New England Biolabs[®] (NEB). Le tampon PCR fourni par NEB ne contient pas de détergent et permet de plus l'analyse des produits d'amplification par électrophorèse microfluidique avec le Bioanalyzer 2100 d'Agilent. L'enzyme *Taq* de cette compagnie est aussi moins cher à l'achat que celle des compagnies Promega et Roche. Par contre, les conditions testées ne permettent une sensibilité que de 5 copies avec la combinaison tampon-enzyme de NEB alors que la combinaison de réactifs de Promega décrite par Maheux et collègues [124] permettait l'amplification d'approximativement 1 copie d'ADN cible. Les 2 essais PCR ciblant *E. coli* et les entérocoques ont donc ensuite été optimisés afin d'améliorer la sensibilité de la réaction PCR réalisés avec les réactifs de la compagnie NEB.

3.2.1.3 Optimisation de l'essai PCR utilisant les réactifs de NEB

Le tampon réactionnel PCR de NEB doit être optimisé afin de permettre une amplification PCR aussi sensible que celle décrite par Maheux et collègues[124].

Les conditions d'amplification PCR des essais utilisant les réactifs de NEB ont d'abord été optimisées en évaluant l'influence de la variation des concentrations de BSA et de $MgCl_2$ dans le tampon de réaction. La BSA et le $MgCl_2$ sont connus pour influencer la performance des essais d'amplification PCR sur deux plans. Le BSA permet de limiter l'influence des inhibiteurs de PCR en stabilisant les unités enzymatiques [132] et le $MgCl_2$ est connu pour améliorer la processivité de l'enzyme en influençant la réaction entre l'ADN cible et les amorces [114].

Le tableau 11 résume l'expérience d'optimisation de ces deux paramètres en comparant le rendement d'essais PCR utilisant différentes concentrations de BSA et $MgCl_2$. Le rendement des réactions est ensuite comparé à l'amplification PCR réalisé avec notre standard, la combinaison tampon et *Taq* Promega. Toutes ces réactions ont été effectuées en triplicata avec une dilution d'ADNg purifiée correspondant à 10 copies de génomes d'*E. coli* ATCC 11775 (CCRI 467) comme spécimen cible.

Tableau 11 :Optimisation des concentrations de BSA et MgCl₂ pour l'essai PCR avec l'enzyme *Taq* de NEB dans le tampon de NEB

	1.5 mg/mL BSA	2.0 mg/mL BSA	2.5 mg/mL BSA
2.25 mM MgCl ₂	+	+	+
2.50 mM MgCl ₂	+++	++	+
2.75 mM MgCl ₂	++	+	+

Légende :
 +++ Cette combinaison a permis une forte amplification de 10 copies d'ADNg d'*E. coli* 3 fois sur 3, tel que visualisé par l'intensité des bandes sur gel d'agarose 2%
 ++ Ces combinaisons ont aussi permis l'amplification de 10 copies d'ADNg d'*E. coli* 3 fois sur 3. Des précipités ont cependant été observés dans les tubes de réactions PCR, tel que visualisé par l'intensité des bandes sur gel d'agarose 2%
 + Ces combinaisons n'ont permis que de faibles amplifications du triplicata d'ADNg, tel que visualisé par l'intensité des bandes sur gel d'agarose 2%

La combinaison de 1.5 mg/mL de BSA et 2.50 mM de MgCl₂ permet les réactions d'amplification PCR les plus performantes et sera utilisée pour les expériences subséquentes. Les mélanges réactionnels illustrés par « ++ » au tableau 11 ont aussi permis l'amplification des cibles (*E. coli* + contrôle interne) mais des précipités ont été observés dans les tubes suite au thermocyclage. La formation de précipité indique la non-homogénéité du mélange réactionnel ce qui peut diminuer la sensibilité de l'essai PCR. Une hypothèse émise par notre groupe veut que le surfactant anionique Triton X-100[®] dans le tampon de Promega sert à limiter l'agrégation des unités enzymatiques *Taq*, de manière à augmenter leur processivité, c'est-à-dire la faculté des enzymes à se lier et amplifier l'ADN.

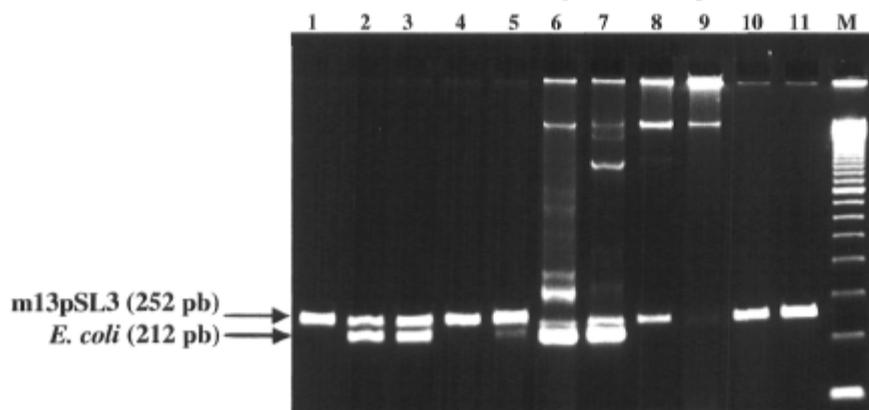
Des expériences subséquentes de sensibilité fine de l'essai ciblant *E. coli* démontrent la faculté de la combinaison 1.5 mg/mL de BSA et 2.50 mM de MgCl₂ à pallier à l'absence du détergent. En effet, une sensibilité d'approximativement 1 copie d'ADNg purifiée d'*E. coli* a été détectée 4 fois sur 4 avec l'essai nouvellement optimisé utilisant les réactifs NEB. Les essais PCR utilisant les réactifs NEB sont donc dorénavant aussi sensibles que lorsque nous utilisons la combinaison *Taq*-tampon de Promega.

3.2.1.4 Influence du nombre de cycle de PCR pour l'amplification sensible d'un produit WGA

La surveillance microbiologique sur le terrain requiert l'exécution de routine des protocoles permettant la détection des indicateurs de contamination fécale. Lors de l'étude *Nituuchischaayihitaaau aschii* durant l'été 2005, en plus des méthodes de microbiologie classique présentée au chapitre 2, nous avons tenté de réaliser à bord du MMCM les méthodes de détection moléculaire des indicateurs de contamination fécale telles que décrites par Maheux et collègues [124]. Même en modifiant ces méthodes moléculaires en ajoutant l'étape de précipitation à l'éthanol, telle que décrite plus haut, de trop nombreuses réactions croisées d'amplification ont rendu inutilisables les données de biologie moléculaire produites lors de cette étude. En effet, les contrôles méthodologiques servant à valider l'absence de contamination non désirée lors du déroulement des méthodes de détection (contrôles négatifs WGA et PCR, voir figure 12 et 13) ont permis d'observer une augmentation longitudinale de la présence d'ADN contaminants. Ces activités ont souligné l'importance à accorder à la contamination croisée entre les essais de détection moléculaire dans un environnement moins contrôlé comme le MMCM.

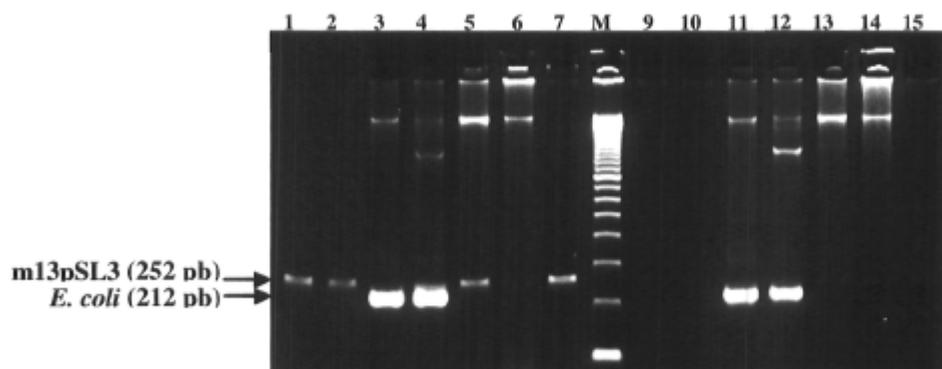
Une des façons de diminuer le risque de contamination croisée, tout en diminuant le temps d'analyse, est de diminuer le nombre de cycles d'amplification PCR. L'objectif de cette prochaine expérience est d'évaluer l'impact de la diminution du nombre de cycles PCR sur la sensibilité fine des essais PCR nouvellement optimisés et décrits ci-haut. L'expérience illustrée à la figure 10 a été réalisée en amplifiant un gradient de 10, 5, 1 et 0,5 copies de génome d'*E. coli* ATCC 11775 (CCRI 467) par PCR et par la combinaison WGA-PCR.

Figure 10 : Sensibilité fine de l'essai d'amplification moléculaire par PCR et par WGA+PCR ciblant *E. coli* à 40 cycles d'amplification PCR



Électrophorèse sur gel d'agarose 2% et migration à 170 volts pendant 40 minutes. Les spécimens d'amplification ont été obtenus par des dilutions d'ADNg d'*E. coli* ATCC 11775 (CCRI 467). Puits : **1**, 0 copie d'ADNg d'*E. coli* (contrôle négatif de salle PCR); **2-5 : PCR à 40 cycles**; **2**, 10 copies ADNg d'*E. coli*; **3**, 5 copies ADNg d'*E. coli*; **4**, 2.5 copies ADNg d'*E. coli*; **5**, 1.25 copies ADNg d'*E. coli*; **6-9 : WGA+PCR à 40 cycles**; **6**, 10 copies ADNg d'*E. coli*; **7**, 5 copies ADNg d'*E. coli*; **8**, 2.5 copies ADNg d'*E. coli*; **9**, 1.25 copies ADNg d'*E. coli*; **10**, 0 copies d'ADNg d'*E. coli* (contrôle négatif #1 de la salle spécimen); **11**, 0 copies d'ADNg d'*E. coli* (contrôle négatif #2 de salle spécimen); **M**, échelle de poids moléculaire de 100 paires de bases. Les hauteurs des différents produits d'amplification sont aussi indiquées.

Figure 11 : Sensibilité fine de l'essai d'amplification moléculaire (WGA + PCR) ciblant *E. coli* à 35 ET 30 cycles d'amplification PCR



Électrophorèse sur gel d'agarose 2%, migration à 170 volts pendant 40 minutes. Les spécimens d'amplification ont obtenus par des dilutions d'ADNg d'*E. coli* ATCC 11775 (CCRI 467). Puits : **1-7 WGA+PCR à 35 cycles** ; **1**, 0 copie d'ADNg d'*E. faecalis* (contrôle négatif de salle PCR) ; **2**, 0 copie d'ADNg d'*E. coli* (contrôle négatif #1 de salle spécimen) ; **3**, 10 copies ADNg d'*E. faecalis* ; **4**, 5 copies ADNg d'*E. faecalis* ; **5**, 2.5 copies ADNg d'*E. faecalis* ; **6**, 1.25 copies ADNg d'*E. faecalis* ; **7**, 0 copie d'ADNg d'*E. coli* (contrôle négatif #2 de salle spécimen) ; **M** échelle de poids moléculaire de 100 paires de bases ; **9-15 : WGA+PCR à 30 cycles** ; **9**, 0 copie d'ADNg d'*E. faecalis* (contrôle négatif de salle PCR) ; **10**, 0 copie d'ADNg d'*E. coli* (contrôle négatif #1 de salle spécimen) ; **11**, 10 copies ADNg d'*E. coli* ; **12**, 5 copies ADNg d'*E. coli* ; **13**, 2.5 copies ADNg d'*E. coli* ; **14**, 1.25 copies ADNg d'*E. coli* ; **15**, 0 copies d'ADNg d'*E. coli* (contrôle négatif #2 de la salle spécimen). Les hauteurs des différents produits d'amplification sont aussi indiquées.

La présence systématiques des 2 bandes représentant 10 et 5 copies d'ADNg de *E. coli* sur les 2 électrophorégrammes indique la possibilité de diminuer le nombre de cycles d'amplification PCR jusqu'à 30, sans diminuer la sensibilité de l'essai. L'absence de bandes dans les puits correspondants aux amplifications de 2.5 et de 1.25 copies de génome est probablement due à la cumulation des erreurs relatives associées à la dilution de l'ADNg et non à la sensibilité de l'essai PCR. Des résultats comparables ont été obtenus avec les essais PCR et WGA+PCR détectant les entérocoques. Les essais devront être améliorés en ajustant la concentration de contrôle interne étant donné leur faible intensité suite à 30 cycles d'amplification. En ce qui a trait à l'amplification de la cible, 30 cycles de PCR seraient suffisant pour tester la présence des indicateurs *E. coli* et *E. faecalis* à partir de produits d'amplification WGA.

3.2.1.5 Spécificité des essais indicateurs optimisés

L'essai d'amplification PCR utilisant la combinaison enzyme *Taq* et tampon réactionnel de NEB et ciblant *E. coli* est maintenant aussi sensible et les signaux sur gels sont aussi intenses que l'essai utilisant les réactifs de Promega. Nous avons cependant observés au fil des expériences, des faibles bandes de produits amplification dans les puits correspondant aux contrôles négatifs (0 copie d'ADNg, résultats non publiés). En ce qui a trait à l'essai *E. coli*, nos résultats avec ces contrôles négatifs varient selon l'utilisation de différents lots de l'enzyme *Taq* de NEB. Par contre, les contrôles négatifs de l'essai PCR ciblant les entérocoques n'ont jamais produit d'amplicons non-spécifiques. Nous sommes d'avis que les faibles bandes sont probablement issues de l'amplification d'ADN d'*E. coli* contaminant qui se trouve dans certains lots de réactifs PCR de NEB, probablement dans la solution d'enzyme. En effet, comme la plupart des compagnies de biotechnologies, NEB produit une enzyme *Taq* recombinante dans un système d'expression *E. coli*. Les méthodes de purification des enzymes ne pourraient se débarrasser de 100% des contaminants d'acides nucléiques. Il a d'ailleurs récemment été révélé que ce problème soit largement répandu chez les fournisseurs d'enzymes [133].

L'essai PCR ciblant *E. coli* ne peut donc plus être réalisé en utilisant l'enzyme *Taq* de NEB étant donné l'amplification non spécifique de contaminants d'acides nucléiques retrouvé dans la solution enzymatique *Taq*. Nos expériences précédentes de criblage comparatif avaient permis d'observer la compatibilité de l'enzyme *Taq* de Promega avec le tampon de NEB, quoique cette combinaison produise des bandes d'amplification moins intenses qu'avec la *Taq* de NEB à l'analyse aux UV suite à l'électrophorèse sur gel d'agarose 2% (Tableau 10). Afin d'obtenir des produits d'amplification comparables à ceux obtenus avec la combinaison de réactifs de NEB, nous avons testé la possibilité d'utiliser 2 fois plus d'enzyme *Taq* de Promega dans le tampon de réaction de NEB et dans les conditions nouvellement optimisées en concentrations de BSA et $MgCl_2$. L'utilisation d'une concentration plus élevée en enzyme influence cependant peut-être la spécificité de l'essai PCR, c'est-à-dire sa capacité à amplifier uniquement la séquence de l'organisme cible. Le tableau 12 illustre les résultats obtenus suite à l'évaluation de la spécificité de l'essai PCR

ciblant *E. coli* et utilisant 2 fois la concentration d'enzyme *Taq* de Promega ainsi que celui ciblant les entérocoques utilisant 1 fois la concentration d'enzyme *Taq* de NEB, tous deux dans le tampon fourni par NEB et additionné des concentrations optimisées de BSA et de $MgCl_2$. Le seul paramètre qui varie entre les deux essais ciblant *E. coli* et les entérocoques est donc la provenance de l'enzyme ainsi que sa concentration.

Les espèces bactériennes dont les génomes sont testés par cette expérience ont été choisies en fonction de leur rapprochement phylogénétique avec l'organisme cible. Le rapprochement a été réalisé en comparant les séquences du gène ciblé par les essais d'amplification PCR élaborés par notre équipe, le gène *tuf* [124, 129].

Tableau 12 :Spécificité des essais PCR ciblant les indicateurs de contamination fécale

Espèces bactériennes phylogénétiquement rapprochées	Numéro d'identification		Résultat PCR
<i>E. coli</i> (essai avec 2X de <i>Taq</i> Promega)			
<i>Shigella dysenteriae</i>	CCRI 744	ATCC 11835	+
<i>Salmonella choleraesuis</i>	CCRI 717	ATCC 14028	-
<i>Escherichia fergusonii</i>	CCRI 504	ATCC 35469	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRI 563	ATCC 29011	-
<i>Shigella sonnei</i>	CCRI 748	ATCC 29930	+
<i>Shigella flexneri</i>	CCRI 746	ATCC 12022	+
<i>Citrobacter freundii</i>	CCRI 429	ATCC 8090	-
<i>Citrobacter koseri</i>	CCRI 2794		-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	CCRI 488	ATCC 27989	-
<i>Raoultella planticola</i>	CCRI 556	ATCC 33531	-
<i>Listeria innocua</i>	CCRI 144	ATCC 33090	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CCRI 346	ATCC 44105	-
<i>Escherichia coli</i>	CCRI 467	ATCC 11775	+
<i>Vibrio cholerae</i>	CCRI 760	ATCC 25870	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CCRI 705	ATCC 13525	-
<i>Aquabacterium parvum</i>	CCRI 9580	ATCC 11968	-
<i>E. faecalis</i> (essai avec 1X de <i>Taq</i> NEB)			
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCRI 148	ATCC 15313	-
<i>Granulicatella adiacens</i>	CCRI 9500	ATCC 49175	+
<i>Gemella haemolysans</i>	CCRI 119	ATCC 10379	+
<i>Vagococcus fluvialis</i>	CCRI 8859		-
<i>Streptococcus epidermidis</i>	CCRI 202	ATCC 14990	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ;	CCRI 8502	ATCC	-
<i>Bacillus subtilis</i>	CCRI 16	ATCC 6051	-
<i>Bacillus cereus</i>	CCRI 11	ATCC 14579	+
<i>Vibrio cholerae</i>	CCRI 760	ATCC 25870	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CCRI 705	ATCC 13525	-
<i>Aquabacterium parvum</i>	CCRI 9580	ATCC 11968	-

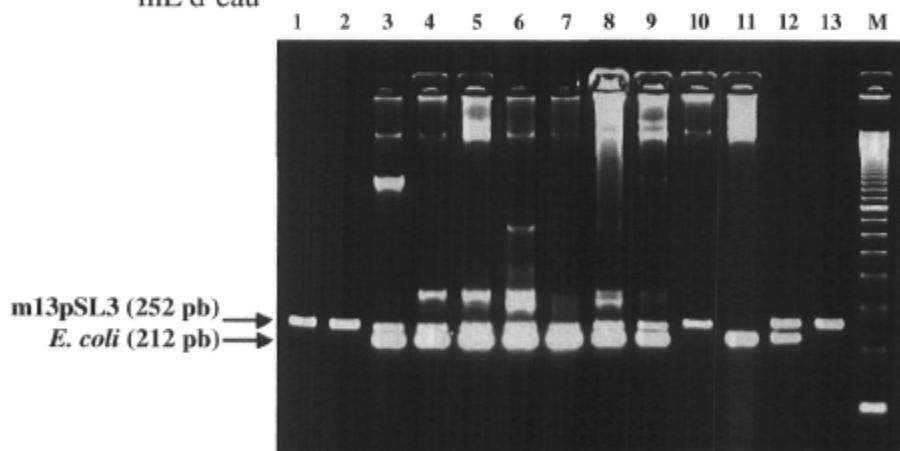
Légende : Les spécimens cibles utilisés pour ces tests de spécificité sont des solutions à 0,1 ng d'ADNg / μ L, diluées sous la hotte biologique à partir de solutions mères de 10 ng/ μ L. Ces solutions mères ont été préparées au CRI entre 1998 et 2005.

L'utilisation de 2x de *Taq* Promega ou 1x d'enzyme *Taq* de NEB ainsi que l'optimisation des concentrations de BSA et de MgCl₂ ne diminuent pas la spécificité des essais; des résultats concordants à ceux-ci ont été obtenus auparavant par Andrée F. Maheux (non publiés). Ceci confirme la validité de l'utilisation des combinaisons spécifiques à l'essai *E. coli* (2X enzyme *Taq* de Promega, tampon de réaction NEB, 1.5 mg/mL de BSA et 2.5 mM de MgCl₂) et à l'essai entérocoques (1x enzyme *Taq* de NEB, tampon de réaction NEB, 1.5 mg/mL de BSA et 2.5 mM de MgCl₂) pour l'amplification rapide, sensible et spécifique de ces indicateurs de contamination fécale. Ces essais PCR doivent maintenant être intégrés dans les méthodes de détection moléculaire combinant WGA et PCR.

3.2.1.6 Reproductibilité des méthodes moléculaires nouvellement optimisées et permettant la détection d'*E. coli* et des entérocoques

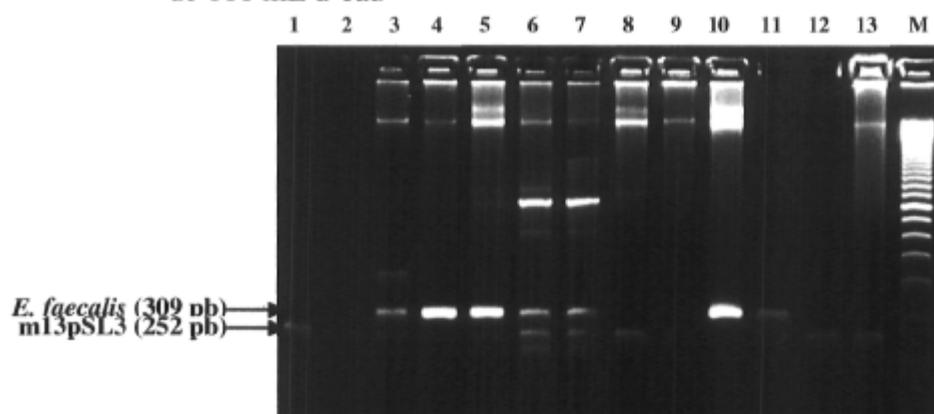
La méthode de détection moléculaire ciblant *E. coli* à partir d'échantillons d'eau 100 mL d'eau a été décrite par Maheux et collègues [124] et la portion « essai PCR » (Figure 7) a été optimisée au cours des présentes études afin de pouvoir transférer la méthode sur le MMCM. Avant de pouvoir réaliser ce transfert, la reproductibilité des méthodes composées des essais PCR nouvellement optimisés, doit être validée au CRI. La reproductibilité se définit ici comme la capacité d'une méthode à être réalisée à plusieurs reprises et pendant une longue période de temps, tout en produisant les mêmes résultats. Les figures 12 et 13 illustrent la sensibilité obtenue lors de la première tentative de reproduction de ces méthodes de détection moléculaire nouvellement optimisées. Ces méthodes ont été testées à 4 reprises et les résultats sont résumés au tableau 13.

Figure 12: Sensibilité fine de la méthode de détection moléculaire additionnée de l'essai WGA+PCR nouvellement optimisé pour la détection de *E. coli* à partir de 100 mL d'eau



Électrophorèse sur gel d'agarose 2%, migration à 170 volts pendant 40 minutes. Puits : **1**, contrôle négatif de salle PCR ; **2**, contrôle négatif #1 de salle spécimen ; **3**, 20 UFC d'*E. coli* ; **4**, 10 UFC d'*E. coli* ; **5**, 5 UFC d'*E. coli* ; **6**, 2.5 UFC d'*E. coli* ; **7**, 1.25 UFC d'*E. coli* ; **8**, 0.6 UFC d'*E. coli* ; **9**, 0.3 UFC d'*E. coli* ; **10**, 0 copies ADNg (contrôle négatif de filtration) ; **11**, 10 copies d'ADNg (contrôle positif d'amplification WGA) ; **12**, 10 copies d'ADNg (contrôle positif de PCR) ; **13**, 0 copies d'ADNg (contrôle négatif #2 de salle spécimen) ; **M**, échelle de poids moléculaire de 100 paires de bases. Les hauteurs des différents produits d'amplification sont aussi indiquées.

Figure 13: Sensibilité fine de la méthode de détection moléculaire additionnée de l'essai WGA+PCR nouvellement optimisé pour la détection des entérocoques à partir de 100 mL d'eau



Électrophorèse sur gel d'agarose 2%, migration à 170 volts pendant 40 minutes. Puits : **1** contrôle négatif de salle PCR ; **2**, contrôle négatif #1 de salle spécimen ; **3**, 20 UFC d'*E. faecalis* ; **4**, 10 UFC d'*E. faecalis* ; **5**, 5 UFC d'*E. faecalis* ; **6**, 2.5 UFC d'*E. faecalis* ; **7**, 1.25 UFC d'*E. faecalis* ; **8**, 0.6 UFC d'*E. faecalis* ; **9**, 0.3 UFC d'*E. faecalis* ; **10**, 0 copies ADNg d'*E. faecalis* (contrôle négatif de filtration) ; **11**, 10 copies d'ADNg d'*E. faecalis* (contrôle positif d'amplification WGA) ; **12**, 10 copies d'ADNg d'*E. faecalis* (contrôle positif de PCR) ; **13**, 0 copies d'ADNg d'*E. faecalis* (contrôle négatif #2 de salle spécimen) ; **M**, échelle de poids moléculaire de 100 paires de bases. Les hauteurs des différents produits d'amplification sont aussi indiquées.

Selon cette première tentative, les méthodes de détection moléculaire par WGA+PCR nouvellement optimisées ciblant *E. coli* et les entérocoques détectent respectivement 0,3 et 1,25 UFC à partir d'un échantillon d'eau de 100 mL. Ces résultats se comparent à ceux obtenus en ciblant de l'ADNg purifié. Les deux méthodes de détection ont été reproduites à trois reprises chacune afin de valider leur reproductibilité au CRI avant d'effectuer leur transfert sur le MMCM.

Tableau 13: Reproductibilité de la sensibilité fine des méthodes de détection moléculaire additionnées des essais WGA+PCR respectifs et nouvellement optimisés pour la détection de *E. coli* et des entérocoques

UFC /100 mL	Tentative 1		Tentative 2		Tentative 3		Tentative 4		Reproductibilité de la sensibilité
	<i>E. coli</i>	<i>E. fs</i>							
20	+	+	-	+	+	-	+	+	6/8
10	+	+	-	-	-	-	+	-	3/8
5	+	+	-	-	+	-	+	-	3/8
2,5	+	+	-	+	+	-	-	-	4/8
1,25	+	+	-	+	-	-	-	-	3/8
0,6	+	+	+	+	-	-	-	-	4/8
0,3	+	-	-	-	-	-	-	-	1/8
CRTL négatif (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	0/8

Les « + » représentent la présence de bandes visualisées par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. Les « - » représente l'absence de bandes visualisées par électrophorèse sur gel d'agarose 2%.

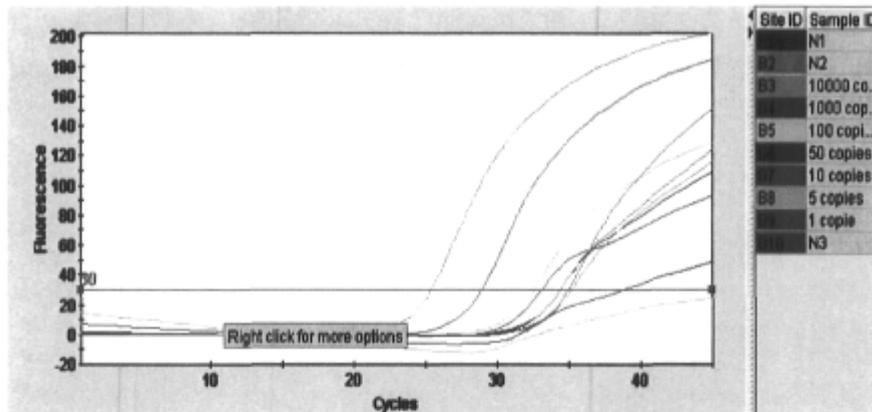
Ces 4 tentatives de réalisation des méthodes moléculaires par WGA+PCR nouvellement optimisées n'ont pas donné des résultats reproductibles. On observe aussi une diminution graduelle de la sensibilité des méthodes de détection à travers le temps. Telles quelles, ces méthodes moléculaires ne démontrent pas la reproductibilité requise pour faire l'objet d'un transfert technologique à bord du MMCM.

L'utilisation d'une technologie de détection en temps réel a été envisagée pour la portion « essai PCR » afin de pallier aux différentes contraintes imposées par la méthode de PCR classique, ainsi que pour limiter l'impact de la contamination croisée entre les réactions d'amplification non- et spécifiques.

3.2.1.7 Adaptation de l'essai PCR ciblant *E. coli* en PCR en temps réel sur Smart Cycler

La rapidité de l'analyse, la contrainte d'espace de travail sur le MMCM ainsi que la problématique engendrées par la détection de contaminations moléculaires croisées lors de l'étude longitudinale en territoire Cri (résultats non publiés) sont trois facteurs qui favorisent l'implantation de la technologie de PCR en temps réel à bord du MMCM. Une première expérience d'adaptation a été effectuée en toute fin d'étude pour évaluer la capacité de l'essai PCR ciblant *E. coli* à être transféré sur une plateforme de PCR en temps réel. Nous avons réalisé la détection moléculaire de 10 000, 1000, 100, 50, 10, 5 et 1 copie de génome d'*E. coli* ATCC 11775 (CCRI 467) sur Smart Cycler par incorporation de SYBR green. Brièvement, le SYBR green est une molécule pouvant se fixer sur tous les types d'acides nucléique et devenant alors un fluorophore. Il sert de marqueur radioactif pour un grand nombre de méthodes, dont la détection d'ADN double brin sur gels d'agarose. Il permet également de quantifier les acides nucléiques en solution et, n'interférant que peu avec la réaction en chaîne par polymérase, il est le principal marqueur utilisé en PCR en temps réel. La figure 14 illustre la sensibilité obtenue par l'essai de détection adapté de l'essai classique tandis que la figure 16 démontre la possibilité d'utiliser cette technologie en utilisant les amorces d'*E. coli* utilisées dans l'essai tel que décrit par Maheux et collègues [124].

Figure 14 : Sensibilité au cycle seuil de la version initiale de l'essai de détection ciblant *E. coli* adapté sur PCR en temps réel

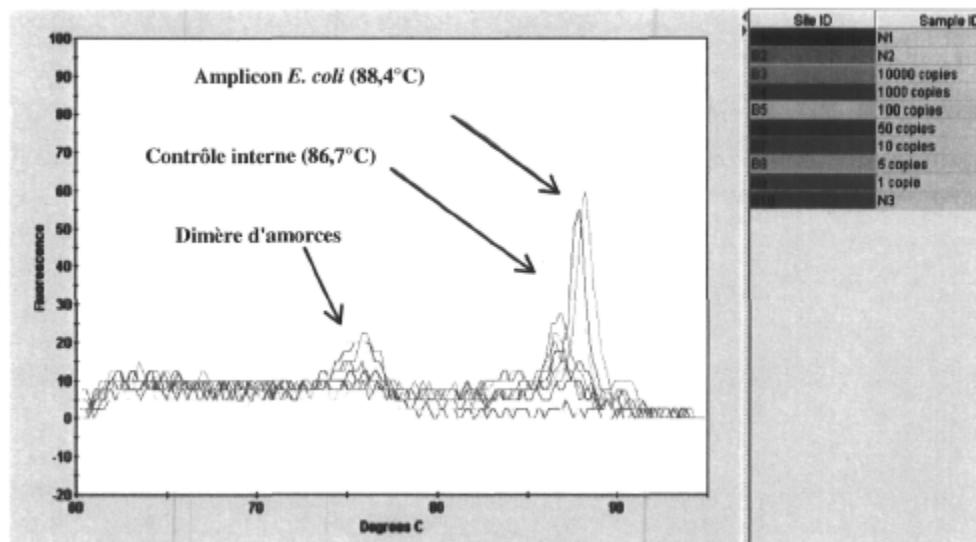


Légende : Les courbes de couleur représentent l'évolution au gré des cycles thermiques (axe des x) de la production d'amplicons et donc d'incorporation de SYBR Green (axe des y) à partir de différentes concentrations d'ADNg de départ (tableau de droite). Les courbes correspondant aux échantillons B1(N1) B2(N2) et B10(N3) sont des contrôles négatifs et l'amplification visualisée reflète la présence du contrôle interne.

Cet essai d'amplification PCR a été analysé en temps réel grâce à l'incorporation de SYBR Green au cours de la synthèse des amplicons. On observe que la courbe rouge (B7) correspondant à 10 copies de génome cible sort au-dessus du cycle seuil de 30 qu'après de nombreuses étapes de cyclage. Cette courbe n'est pas représentative d'une amplification spécifique. On en conclut donc que la sensibilité de l'essai *E. coli* est d'approximativement 50 copies d'ADNg cible.

Suite à l'amplification par PCR, les courbes des températures de fusion ont été analysées. Les produits d'amplification ont pour ce faire été refroidis dans l'appareil à 65°C et graduellement chauffés jusqu'à 95°C à un rythme de 0.2°/seconde. Cette analyse permet l'identification des produits d'amplification et donc de visualiser la présence ou l'absence d'ADN dans l'échantillon de départ.

Figure 15 : Température de fusion des produits d'amplification obtenus par l'essai PCR en temps réel ciblant *E. coli*



Légende : Les températures de fusion obtenues sont discriminantes entre les amplicons de contrôle interne et les amplicons d'*E. coli*. Le signal de la libération de la fluorescence est fonction de la température de désappariement des produits d'amplification et la hauteur du pic reflète la quantité d'amplicons produits.

Ce résultat laisse entrevoir la possibilité d'utiliser la technologie de PCR en temps réel pour l'amplification mais aussi l'analyse quantitative de l'amplification. Cette technologie contourne donc les contraintes d'espaces du MMCM étant donné la fusion de la portion « essai PCR » avec celle de l'analyse semi quantitative de la présence d'amplicons (Figure 7). Cette technologie permettrait donc d'éviter le transport et l'utilisation du Bioanalyzer 2100 d'Agilent lors de futures études de surveillance de la qualité de l'eau en région éloignée.

Chapitre IV

Discussion

L'eau demeure à ce jour un vecteur de transmission pour d'importants pathogènes qui infectent l'homme. Malgré les cent cinquante ans de recherche sur les méthodes d'évaluation de la contamination microbiologique de l'eau, des millions d'hommes et de femmes s'infectent chaque année en buvant de l'eau et ce, même dans les pays développés où l'eau de consommation est analysée et traitée.

Les méthodes les plus utilisées pour évaluer la qualité microbiologique de l'eau se basent sur la culture de microorganismes bactériens dits indicateurs, lesquels doivent correspondre à une série de critères définis il y a de cela plus de 40 ans. On observe que les indicateurs ont été développés en fonction des besoins des grandes agglomérations urbaines situés dans des régions tempérés du globe. On observe également que ces méthodes de détection ne peuvent pas attester de la présence/absence des pathogènes viraux, bactériens inactifs ou encore parasitaires retrouvés dans l'eau.

De plus, dans le contexte actuel de changements climatiques, de surpopulation et de développement des régions éloignées, nous observons des changements de distribution des microorganismes dans l'environnement ainsi que l'augmentation de l'émergence de pathogènes infectieux [134, 135]. Ceci n'empêche en rien certaines populations, notamment des Premières Nations du Canada, de s'approvisionner à même les cours d'eau et les lacs.

La qualité microbiologique des eaux brutes utilisées pour la consommation par la population Crie de Mistissini (Province de Québec) a d'ailleurs été évaluée durant l'été 2005 au cours d'une étude de santé publique. Des méthodes de détection classique de filtration sur membrane et de nombre le plus probable ont pour ce faire été validement utilisées à bord du MMCM. Des méthodes moléculaires permettant la détection des indicateurs fécaux ont été testées en parallèle. Les résultats des analyses moléculaires ont

cependant été rendues inutilisables de par le trop grand nombre de réactions d'amplifications croisées observées dans les contrôles méthodologiques.

À notre avis, il s'agit de la première démonstration de l'habileté d'un laboratoire mobile à effectuer des analyses microbiologiques classiques contrôlées en région éloignée. Cette démonstration permet aussi d'affirmer que le MMCM offre une plateforme de transfert technologique sur laquelle des méthodes de pointe pourront être comparées à une technologie standardisée, contrôlée.

Il existe d'autres laboratoires mobiles dans le monde qui peuvent être déployés pour divers projet d'analyses environnementales. Le Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec possède ainsi trois laboratoires mobiles, dont deux sont dédiés à la caractérisation de l'environnement (http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/etudeterrain/labo_mobiles.htm). L'agence de médecine préventive en France, en partenariat avec l'Institut Pasteur, a construit un laboratoire mobile de bactériologie qui participe à des études épidémiologiques, particulièrement au Burkina Faso. L'US EPA et l'USGS possèdent aussi des laboratoires mobiles qui leur permettent d'effectuer diverses analyses microbiologiques [136]. Par ailleurs, aucune publication scientifique ne fait état de l'utilisation d'un laboratoire mobile lors de campagnes de surveillance de la qualité microbiologique de l'eau brute en région éloignée.

Suite à l'analyse de la présence des indicateurs de contamination fécale dans les sites environnementaux, il est intéressant de se questionner sur la pertinence de l'utilisation de ces standards dans les régions désertiques ou tropicales ou encore tempérées mais loin des agglomérations urbaines et de l'activité humaine. La présence des indicateurs de contamination fécale en régions éloignées signifie-t-elle le même risque que lorsqu'ils sont retrouvés dans les régions pour lesquelles ils ont été développés? Les standards de qualité microbiologique de l'eau potable se sont développés pour évaluer le risque relié à la consommation d'eau traitée. Les méthodes de détection des indicateurs évalués dans ce mémoire n'ont pas été développées pour évaluer la qualité des eaux brutes. La qualité microbiologique de l'eau en région éloignée ne peut être évaluée avec certitude en utilisant ces indicateurs. La détection directe des pathogènes viraux, bactériens et parasitaire par des

méthodes moléculaires ne serait-elle pas une manière plus précise d'assurer l'absence de risque associé à la consommation d'eau brute

L'environnement de laboratoire contrôlé retrouvé au CRI a permis le développement de méthodes de détection moléculaire ciblant deux importants indicateurs de contamination fécale : *E. coli* et les entérocoques dont la procédure est détaillée dans un article récemment soumis pour publication [124]. L'utilisation des ces méthodes de détection lors de campagnes de surveillance environnementale en territoire éloigné à bord du MMCM nécessite cependant de nombreux ajustements, étant donné les contraintes technologiques et d'espace imposées par l'utilisation de ce module scientifique mobile.

L'utilisation du Bioanalyzer 2100 d'Agilent a été d'ailleurs la source de bien des défis. Elle a requis l'optimisation des méthodes de détection, en particulier de l'étape d'amplification PCR. En effet, les produits d'amplification obtenus par la méthode moléculaire telle que détaillée par Maheux et collègues [124] ne peuvent être analysés sur l'appareil d'Agilent. Il est de notre avis que la présence de Triton X-100 dans le tampon réactionnel de Promega est la cause de cette incompatibilité. La réalisation des méthodes de détection moléculaire a été possible durant l'étude de santé publique *Nituuchischaayihitaaui aschii* durant l'été 2005 grâce à l'application *in extremis* du protocole de précipitation à l'éthanol. Cette technique de purification de l'ADN séparerait le détergent de l'ADN permettant donc l'analyse moléculaire. La précipitation à l'éthanol allonge cependant de 1 à 2 heures le protocole de détection moléculaire en plus de potentiellement diminuer sa sensibilité. De nombreuses trousse de purification de produits d'amplification PCR disponibles chez plusieurs fournisseurs (Qiagen, Clontech, Stratagene, Hylabs, Norgen, GE Healthcare, empbiotech, Axxora, Invitrogen, Roche, etc) auraient pu être utilisées. Cependant, elles engendrent des frais non négligeables alors que les méthodes moléculaires se veulent les moins onéreuses possibles. De plus, l'utilisation de ces trousse occasionne des manipulations supplémentaires non désirées. Nous avons donc testé différentes combinaisons de tampons PCR et d'enzymes *Taq* provenant de différents fournisseurs afin de trouver la combinaison gagnante nous permettant d'amplifier *E. coli* et les entérocoques de manière aussi rapide (6 heures), sensible (1 copie de génome ou 1 UFC) et spécifique

(uniquement les cibles) qu'avec les réactifs de Promega. Ceci a été rendu possible grâce à l'utilisation et l'optimisation des réactifs PCR de la compagnie NEB qui ont été optimisés en concentration de BSA et de $MgCl_2$. Les essais d'amplification PCR nouvellement optimisés ont ensuite été réintégrés dans le schème de détection moléculaire qui a été reproduit à 4 reprises sans obtenir de succès systématique. De nombreux paramètres restent donc à être contrôlés.

D'autres essais d'optimisation fine sont requis avant de pouvoir transférer les méthodes de détection moléculaire (temps de vortexage lors de l'élution, l'impact de l'utilisation de différents filtres composés d'esters de cellulose). De plus, le transfert technologique des essais de détection ne sera possible que suite aux tests d'optimisation et de robustesse effectués au CRI. Deux séries de protocoles expérimentaux ont aussi été rédigées afin de réaliser valablement les méthodes de détection moléculaire au CRI et à bord du MMCM afin d'assurer la reproductibilité des essais dans le temps et indépendamment du manipulateur.

Les recherches contenues dans ce mémoire démontrent la capacité du MMCM à permettre la réalisation de méthodes de microbiologie classique ainsi qu'à offrir une vision du potentiel prometteur du MMCM à accueillir des méthodes moléculaires de pointe pour l'évaluation de la qualité microbiologique de l'eau.

Conclusion

La détection des pathogènes transmissibles par l'eau de consommation demeure un défi auquel l'humanité fait face pour encore bien des générations. Les méthodes classiques d'évaluation de la qualité microbiologique de l'eau sont relativement simples à réaliser mais elles présentent de nombreux désavantages dont la longueur d'analyse et le spectre étroit de microorganismes détectables. Le développement de méthodes moléculaires a été réalisé au CRI et leur adaptation a été initiée afin de permettre leur transfert technologique à bord du MMCM.

Ce projet visait à évaluer la capacité du MMCM à réaliser une campagne de surveillance de la qualité microbiologique de l'eau en région éloignée. Cette étude a requis l'utilisation contrôlée de méthodes de microbiologie classique permettant la détection de microorganismes indicateurs de contamination fécale.

Les résultats relatifs au transfert technologique montrent que l'adaptation des méthodes moléculaires aux contraintes du MMCM n'a pas altéré ni la sensibilité, la spécificité ou la rapidité des méthodes développés par Maheux et collègues. Les méthodes moléculaires telles qu'adaptées lors de présentes études peuvent être transférées à bord du MMCM. Cette conclusion doit être soutenue par d'avantage d'expériences permettant d'assurer la reproductibilité et la robustesse des méthodes moléculaires.

Bibliographie

1. **Paneth, N.** 2004. Assessing the contributions of John Snow to epidemiology: 150 years after removal of the broad street pump handle. *Epidemiology* **15**:514-6.
2. **Hunter, P. R., M. Waite, and E. Ronchi.** 2002. *Drinking Water and Infectious Disease: Establishing the Links*. IWA Publishing, London: pages.
3. **Ashbolt, N. J.** 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* **198**:229-238.
4. **Reiff, F. M., M. Roses, L. Venczel, R. Quick, and V. M. Witt.** 1996. Low-cost safe water for the world: a practical interim solution. *J Public Health Policy* **17**:389-408.
5. **Straub, T. M., and D. P. Chandler.** 2003. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *J Microbiol Methods* **53**:185-197.
6. **Payment, P., J. Siemiatycki, L. Richardson, G. Renaud, E. Franco, and M. Prévost.** 1997. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *Int. J. Environ. Health Res.* **7**:5-31.
7. **Lemarchand, K., and P. Lebaron.** 2003. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. *FEMS Microbiol Lett* **218**:203-209.
8. **Rompere, A., P. Servais, J. Baudart, M. R. de-Roubin, and P. Laurent.** 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J Microbiol Methods* **49**:31-54.
9. **Bell, K. S., J. C. Philp, N. Christofi, and D. W. J. Aw.** 1996. Identification of *Rhodococcus equi* using the polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* **23**:72-74.
10. **Josephson, K. L., C. P. Gerba, and I. L. Pepper.** 1993. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* **59**:3513-3515.
11. **BAPE.** 2000. Les Autochtones, p. 429-485, Rapport de la Commission sur la Gestion de l'eau au Québec: L'eau, ressource à protéger, à partager et à mettre en valeur-Tome 1, vol. 142. Bureau d'audiences publiques sur l'environnement, Québec, Québec.
12. **Santé Canada.** 2000. Profil statistique de la santé des Premières Nations au Canada, Ottawa: 98 pages.

13. **Martin, D.** 2005. Quality of drinking water in Nunavik : How a changing climate affects disease. Inuit Tapirit Kanatami Environmental Bulletin : Freshwater in Inuit Communities **3**:13-15.
14. **Briggs, A.** 1961. Cholera and society in the nineteenth century. Journal of Historical Studies **19**:76-96.
15. **Tynan, N.** 2002. Presented at the Economic History Association 62nd Annual Meeting St. Louis.
16. **Troesken, W.** 1999. Typhoid rate and the public acquisition of private waterworks, 1880- 1920. The Journal of Economic History **59**:927-948.
17. **Tallon, P., B. Magajna, C. Lofranco, and K. T. Leung.** 2005. Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. Water, Air, & Soil Pollution **166**:139-166.
18. **Cutler, D., and G. Miller.** 2005. The role of public health improvements in health advances: the twentieth-century United-States. Demography **42**:1-22.
19. **Anderson, Y., and P. Bohan.** 2001. Chap 6: Disease surveillance and waterborne outbreaks. In L. Fewtrell and J. Bartram (ed.), Water quality: guidelines, standards and health. IWA Publishing, London.
20. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev **11**:142-201.
21. **Rosenberg, T., O. Kendall, J. Blanchard, S. Martel, C. Wakelin, and M. Fast.** 1997. Shigellosis on Indian reserves in Manitoba, Canada: its relationship to crowded housing, lack of running water, and inadequate sewage disposal. Am J Public Health **87**:1547-51.
22. **Daniels, N. A., J. Neimann, A. Karpati, U. D. Parashar, K. D. Greene, J. G. Wells, A. Srivastava, R. V. Tauxe, E. D. Mintz, and R. Quick.** 2000. Traveler's diarrhea at sea: three outbreaks of waterborne enterotoxigenic *Escherichia coli* on cruise ships. J Infect Dis **181**:1491-1495.
23. **Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen.** 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med **308**:681-5.
24. **Rangel, J. M., P. H. Sparling, C. Crowe, P. M. Griffin, and D. L. Swerdlow.** 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. Emerg Infect Dis **11**:603-9.

25. **Metcalf, T. G., J. L. Melnick, and M. K. Estes.** 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-A trip of over 50 Years. *Annu Rev Microbiol* **49**:461-487.
26. **Rochelle, P., and J. Clancey.** 2006. The evolution of microbiology in the drinking water industry. *AWWA Journal* **98**:163-191.
27. **Corso, P. S., M. H. Kramer, K. A. Blair, D. G. Addiss, J. P. Davis, and A. C. Haddix.** 2003. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerg Infect Dis* **9**:426-31.
28. **Hrudey, S. E., P. Payment, P. M. Huck, R. W. Gillham, and E. J. Hrudey.** 2003. A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Sci Technol* **47**:7-14.
29. **Leclerc, H., D. A. Mossel, S. C. Edberg, and C. B. Struijk.** 2001. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu Rev Microbiol* **55**:201-234.
30. **Hunter, P. R.** 2003. Climate change and waterborne and vector-borne disease. *J Appl Microbiol* **94 Suppl**:37S-46S.
31. **World Health Organisation.** 2004. Guidelines for drinking-water quality 3rd edition, vol. 1. World Health Organization, Geneva: 494 pages.
32. **Ashbolt, N. J., W. O. K. Grabow, and M. Snozzi.** 2001. Indicators of microbial water quality, p. 289-315. *In* L. Fewtrell and J. Bartram (ed.), *Water Quality: Guidelines, Standards and Health. Risk assessment and management for water-related infectious disease.* IWA Publishing, London.
33. **Bonde, G. J.** 1966. Bacteriological methods for estimation of water pollution. *Health Lab Sci* **3**:124-128.
34. **Dufour, A. P., E. R. Strickland, and V. J. Cabelli.** 1981. Membrane filter method for enumerating *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **41**:1152-8.
35. **Cheung, W. H., K. C. Chang, and R. P. Hung.** 1991. Variations in microbial indicator densities in beach waters and health-related assessment of bathing water quality. *Epidemiol Infect* **106**:329-44.
36. **Seyfried, P. L., R. S. Tobin, N. E. Brown, and P. F. Ness.** 1985. A prospective study of swimming-related illness. I. Swimming-associated health risk. *Am J Public Health* **75**:1068-1070.
37. **Zmirou, D., J. P. Ferley, J. F. Collin, M. Charrel, and J. Berlin.** 1987. A follow-up study of gastro-intestinal diseases related to bacteriologically substandard drinking water. *Am J Public Health* **77**:582-584.

38. **Gerba, C. P., S. M. Goyal, R. L. LaBelle, I. Cech, and G. F. Bodgan.** 1979. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *Am J Public Health* **69**:1116-1119.
39. **LaBelle, R. L., C. P. Gerba, S. M. Goyal, J. L. Melnick, I. Cech, and G. F. Bogdan.** 1980. Relationships between environmental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol* **39**:588-596.
40. **Rose, J. B., P. R. Epstein, E. K. Lipp, B. H. Sherman, S. M. Bernard, and J. A. Patz.** 2001. Climate variability and change in the United States: potential impacts on water- and foodborne diseases caused by microbiologic agents. *Environ Health Perspect* **109 Suppl 2**:211-21.
41. **Havelaar, A. H., M. van Olphen, and Y. C. Drost.** 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol* **59**:2956-2962.
42. **Griffin, D. W., K. A. Donaldson, J. H. Paul, and J. B. Rose.** 2003. Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin Microbiol Rev* **16**:129-143.
43. **Santamaria, J., and G. A. Toranzos.** 2003. Enteric pathogens and soil: a short review. *Int Microbiol* **6**:5-9.
44. **Power, M. L., J. Littlefield-Wyer, D. M. Gordon, D. A. Veal, and M. B. Slade.** 2005. Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from blooms in two Australian lakes. *Environ Microbiol* **7**:361-640.
45. **Crane, S. R., and J. A. Moore.** 1986. Modeling enteric bacterial die-off: A review. *Water, Air, & Soil Pollution* **27**:411-439.
46. **Fujioka, R. S., H. H. Hashimoto, E. B. Siwak, and R. H. F. Young.** 1981. Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Appl Environ Microbiol* **41**:690-696.
47. **Medema, G., M. Bahar, and F. Schets.** 1997. Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, faecal enterococci, and *Clostridium perfringens* in riverwater: Influence of temperature and autochthonous microorganisms. *Wat Sci Technol* **35**:249-252.
48. **Davies, C. M., J. A. Long, M. Donald, and N. J. Ashbolt.** 1995. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol* **61**:1888-1896.
49. **Marino, R. P., and J. J. Gannon.** 1991. Survival of fecal coliforms and fecal streptococci in storm drain sediment. *Water Res* **25**:1089-1098.

50. **Redlinger, T., J. Graham, V. Corella-Barud, and R. Avitia.** 2001. Survival of fecal coliforms in dry-composting toilets. *Appl Environ Microbiol* **67**:4036-4040.
51. **Gerba, C. P., I. L. Pepper, and L. F. Whitehead.** 2001. A risk assessment of emerging pathogens of concern in the land application of biosolids. *Water Sci Technol* **46**:225-230.
52. **LeChevallier, M. W., N. J. Welch, and D. B. Smith.** 1996. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Appl Environ Microbiol* **62**:2201-2211.
53. **Zacheus, O. M., and P. J. Martikainen.** 1995. Occurrence of heterotrophic bacteria and fungi in cold and hot water distribution systems using water of different quality. *Can J Microbiol* **41**:1088-1094.
54. **Jones, H. M. R.** 1936. *B. coli* in the drinking water of ships: The effect of storage. *The Journal of Pathology and Bacteriology* **42**:605-615.
55. **Stevens, M., N. J. Ashbolt, and D. Cunliffe.** 2003. Review of coliforms: as microbial indicators of drinking water quality. National Health and Medical Research Council, Canberra, Australia: 43 pages.
56. **Dufour, A. P.** 1977. *Escherichia coli*: the fecal coliform, p. 48-58. In A. W. Halley and B. J. Dutka (ed.), *Bacterial indicators / health hazards associated with water*, vol. 273. ASTM International, Philadelphia.
57. **Clark, M. L., and E. Gamper.** 2003. A Synoptic Study of Fecal-Indicator Bacteria in the Wind River, Bighorn River, and Goose Creek Basins, Wyoming, June-July 2000 03-4055. U.S. Geological Survey.
58. **McLellan, S. L., A. D. Daniels, and A. K. Salmore.** 2001. Clonal populations of thermotolerant *Enterobacteriaceae* in recreational water and their potential interference with fecal *Escherichia coli* counts. *Appl Environ Microbiol* **67**:4934-8.
59. **Gauthier, F., and F. Archibald.** 2001. The ecology of "fecal indicator" bacteria commonly found in pulp and paper mill water systems. *Water Res* **35**:2207-2218.
60. **Byappanahalli, M. N.** 2000. Assessing the persistence and multiplication of fecal indicator bacteria in Hawaii's soil environment. Ph. D. thesis. University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii, USA.
61. **Fujioka, R., C. Sian-Denton, M. Borja, J. Castro, and K. Morphew.** 1999. Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Guam's streams. *Appl Microbiol Symp Suppl* **85**:83S-89S.

62. **Hardina, C. M., and R. S. Fujioka.** 1991. Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii's streams. *Environ Toxicol Water Qual* **6**:185-195.
63. **Solo-Gabriele, H. M., M. A. Wolfert, T. R. Desmarais, and C. J. Palmer.** 2000. Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Appl Environ Microbiol* **66**:230-237.
64. **Byappanahalli, M. N., R. L. Whitman, D. A. Shively, M. J. Sadowsky, and S. Ishii.** 2006. Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. *Environ Microbiol* **8**:504-13.
65. **Whitman, R. L., and M. B. Nevers.** 2003. Foreshore sand as a source of *Escherichia coli* in nearshore water of a Lake Michigan beach. *Appl Environ Microbiol* **69**:5555-5562.
66. **Whitman, R. L., S. E. Byers, D. A. Shively, D. M. Ferguson, and M. Byappanahalli.** 2005. Occurrence and growth characteristics of *Escherichia coli* and enterococci within the accumulated fluid of the northern pitcher plant (*Sarracenia purpurea L.*). *Can. J. Microbiol./Rev. can. microbiol.* **51**:1027-1037.
67. **Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable du Comité fédéral-provincial-territorial sur la santé et l'environnement.** 2006. Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada, p. 16. Santé Canada.
68. **Schleifer, K. H., and R. Kilpper-Balz.** 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **34**:31-34.
69. **Slanetz, L. W., and C. H. Bartley.** 1957. Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *J Bacteriol* **74**:591-5.
70. **Litsky, W., M. J. Rosenbaum, and R. L. France.** 1953. A comparison of the most probable numbers of coliform bacteria and enterococci in raw sewage. *Appl Microbiol.* **1**:247-250.
71. **McFeters, G. A., G. K. Bissonnette, J. J. Jezeski, C. A. Thomson, and D. G. Stuart.** 1974. Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Appl Environ Microbiol* **27**:823-829.
72. **Chauret, C., N. Armstrong, J. Fisher, R. Sharma, S. Springthorpe, and S. Sattar.** 1995. Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. *J Am Water Works Assoc* **87**:76-84.

73. **Ferguson, C. M., B. G. Coote, N. J. Ashbolt, and I. M. Stevenson.** 1996. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Water Res* **30**:2045-2054.
74. **OECD.** 2003. Assessing microbial safety of drinking water: improving approaches and methods. IWA publishing, Padstow, Cornwall, UK: 291 pages.
75. **AWPRC.** 1991. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res* **25**:529-545.
76. **Kott, Y., N. Roze, S. Sperber, and N. Betzer.** 1974. Bacteriophages as viral pollution indicators. *Wat. Res.* **8**:165-171.
77. **Simkova, A., and J. Cervenka.** 1981. Coliphages as ecological indicators of enteroviruses in various water systems. *Bull World Health Organ* **59**: 611-618.
78. **Stetler, R. E.** 1984. Coliphages as indicators of enteroviruses. *Appl Environ Microbiol* **48**:668-670.
79. **Yates, M. V., C. P. Gerba, and L. M. Kelley.** 1985. Virus persistence in groundwater. *Appl Environ Microbiol* **49**:778-81.
80. **Clesceri, L. S., A. E. Greenberg, and A. D. Eaton.** 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Arnold E. Greenberg ed. American Public Health Association, Washington, D. C.: 1325 pages pages.
81. **Edberg, S. C., M. J. Allen, and D. B. Smith.** 1988. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation method. *Appl Environ Microbiol* **54**:1595-1601.
82. **Köster, W., T. Egli, N. Ashbolt, K. Botzenhart, N. Burlion, T. T. Endo, P. Grimont, E. Guillot, C. Mabilat, L. Newport, M. Niemi, P. Payment, A. Prescott, P. Renaud, and A. Rust.** 2003. Analytical methods form microbiological water quality testing, *Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving Approaches and Methods*, OECD/WHO Drinking Water Quality Series, IWA Publishing, London, pp. 237-295.
83. **American Public Health Association.** 1971. Standard Methods for Analysis of Water and Waste Water, 13th ed. APHA, New York: 1220 pages.
84. **Ciebin, B. W., M. H. Brodsky, R. Eddington, G. Horsnell, A. Choney, G. Palmateer, A. Ley, R. Joshi, and G. Shears.** 1995. Comparative evaluation of modified m-FC and m-TEC media for membrane filter enumeration of *Escherichia coli* in water. *Appl Environ Microbiol* **61**:3940-3942.

85. **Rose, R. E., E. E. Geldreich, and W. Litsky.** 1975. Improved membrane filter method for fecal coliform analysis. *Appl Environ Microbiol* **29**:532-536.
86. **Brenner, K. P., C. C. Rankin, Y. R. Roybal, G. N. J. Stelma, P. V. Scarpino, and A. P. Dufour.** 1993. New medium for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water. *Appl Environ Microbiol* **59**:3534-3544.
87. **Messer, J. W., and A. P. Dufour.** 1998. A rapid, specific membrane filtration procedure for enumeration of enterococci in recreational water. *Appl Environ Microbiol* **64**:678-680.
88. **Means, E. G., and B. H. Olson.** 1981. Coliform inhibition by bacteriocin-like substances in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* **42**:506-512.
89. **McDougald, D., S. A. Rice, D. Weichart, and S. Kjelleberg.** 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology* **25**:1-9.
90. **Oliver, J. D.** 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol Spec No*:93-100.
91. **Oliver, J. D.** 1995. The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett* **133**:203-208.
92. **Gouvernement du Québec.** 2005. Loi sur la qualité de l'environnement : Règlement sur la qualité de l'eau potable. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. L.R.Q., c. Q-2, r.18.1.1.
93. **Slanetz, L. W., D. F. Bent, Bartley, and H. Clara.** 1955. Use of membrane filter technique to enumerate enterococci in water. *Public Health Rep* **70**:67-72.
94. **Scott, T. M., J. B. Rose, T. M. Jenkins, S. R. Farrah, and J. Lukasik.** 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl Environ Microbiol* **68**:5796-5803.
95. **US EPA.** 2002. National Primary Drinking Water Regulations. List of contaminants & their MCLs: Potential health effects from ingestion of water (EPA 816-F-02-013), Washington, DC: pages.
96. **US EPA.** 2002. National Primary Drinking Water Regulations (40CFR141), vol. 19, Washington, DC: 425 pages.
97. **Union Européenne.** 1998. Décret n° 2001-1220 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles, vol. L 110, Bruxelles, Belgique: 38 pages.

98. **Hübner, I., I. Steinmetz, U. Obst, D. Giebel, and D. Bitter-Suermann.** 1992. Rapid determination of members of the family *Enterobacteriaceae* in drinking water by an immunological assay using a monoclonal antibody against enterobacterial common antigen. *Appl Environ Microbiol* **58**:3187-3191.
99. **Obst, U., I. Hübner, M. Wecker, and D. Bitter-Suermann.** 1989. Immunological method using monoclonal antibodies to detect *Enterobacteriaceae* in drinking water. *Aqua* **38**:136-142.
100. **Levasseur, S., M. O. Husson, R. Leitz, F. Merlin, F. Laurent, F. Peladan, J. L. Drocourt, H. Leclerc, and M. Van Hoegaerden.** 1992. Rapid detection of members of the family *Enterobacteriaceae* by a monoclonal antibody. *Appl Environ Microbiol* **58**:1524-1529.
101. **Fayer, R., U. Morgan, and S. J. Upton.** 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* **30**:1305-1322.
102. **Brock, T. D., and H. Freeze.** 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol* **98**:289-297.
103. **Bej, A. K., S. C. McCarty, and R. M. Atlas.** 1991. Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl Environ Microbiol* **57**:2429-32.
104. **Bergeron, M. G., and M. Quellette.** 1995. Diagnosing bacterial infectious diseases in one hour: an essential upcoming revolution. *Infection* **23**:69-72.
105. **Bej, A. K., R. J. Steffan, J. DiCesare, L. Haff, and R. M. Atlas.** 1990. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl Environ Microbiol* **56**:307-14.
106. **Bej, A. K., M. H. Mahbubani, J. L. Dicesare, and R. M. Atlas.** 1991. Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Appl Environ Microbiol* **57**:3529-34.
107. **Spierings, G., C. Ockhuijsen, H. Hofstra, and J. Tommassen.** 1993. Polymerase chain reaction for the specific detection of *Escherichia coli/Shigella*. *Res Microbiol* **144**:557-64.
108. **Fricker, E. J., and C. R. Fricker.** 1994. Application of the polymerase chain reaction to the identification of *Escherichia coli* and coliforms in water. *Lett Appl Microbiol* **19**:44-6.
109. **Call, D. R., F. J. Brockman, and D. P. Chandler.** 2001. Detecting and genotyping *Escherichia coli* O157:H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays. *Int J Food Microbiol* **67**:71-80.

110. **Jothikumar, N., and M. W. Griffiths.** 2002. Rapid Detection of *Escherichia coli* O157:H7 with Multiplex Real-Time PCR Assays. *Appl Environ Microbiol* **68**:3169-3171.
111. **Lleo, M. M., B. Bonato, M. C. Tafi, C. Signoretto, M. Boaretti, and P. Canepari.** 2001. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J Appl Microbiol* **91**:1095-1102.
112. **Tsai, Y. L., and B. H. Olson.** 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**:2292-2295.
113. **Tsai, Y. L., and B. H. Olson.** 1992. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**:754-757.
114. **Wilson, I. G.** 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* **63**:3741-51.
115. **Kalinina, O., I. Lebedeva, J. Brown, and J. Silver.** 1997. Nanoliter scale PCR with TaqMan detection. *Nucl. Acids Res.* **25**:1999-2004.
116. **Cox, T., C. Frazier, J. Tuttle, S. Flood, L. Yagi, C. T. Yamashiro, R. Behari, C. Paszko, and R. J. Cano.** 1998. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in dairy samples utilizing a PCR-based fluorogenic 5' nuclease assay. *J Ind Microbiol Biotechnol* **21**:167-174.
117. **World Health Organization.** 2005. International meeting on the management of water quality in rural and remote communities. World Health Organization, Alice Springs.
118. **Dick, L. K., and K. G. Field.** 2004. Rapid estimation of numbers of fecal bacteroidetes by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **70**:5695-5697.
119. **Blanco, L., A. Bernad, J. M. Lazaro, G. Martin, C. Garmendia, and M. Salas.** 1989. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem* **264**:8935-8940.
120. **Dean, F. B., J. R. Nelson, T. L. Giesler, and R. S. Lasken.** 2001. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res* **11**:1095-1099.
121. **Sato, M., M. Ohtsuka, and Y. Ohmi.** 2005. Usefulness of repeated GenomiPhi, a phi29 DNA polymerase-based rolling circle amplification kit, for generation of large amounts of plasmid DNA. *Biomolecular Engineering* **22**:129-132.

122. **Ballantyne, K. N., R. A. van Oorschot, and R. J. Mitchell.** 2006. Comparison of two whole genome amplification methods for STR genotyping of LCN and degraded DNA samples. *Forensic Sci Int* **166**:35-41.
123. **Gonzalez, J. M., M. C. Portillo, and C. Saiz-Jimenez.** 2005. Multiple displacement amplification as a pre-polymerase chain reaction (pre-PCR) to process difficult to amplify samples and low copy number sequences from natural environments. *Environmental Microbiology* **7**:1024-1028.
124. **Maheux, A. F., L. Bissonnette, M. Boissinot, F. J. Picard, J. L. T. Bernier, S. Paradis, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron.** 2006. Rapid DNA-based assay for detection of *Escherichia coli* from drinking water samples. *Appl Env Micro* (sous presse).
125. **CASES ArcticNet and Québec-Océan.** NGCC Amundsen: Brise-glace de recherche canadien. Accédé le 2006/08/01. Disponible au <http://www.amundsen.quebec-ocean.ulaval.ca/>.
126. **Picard, F. J., and M. G. Bergeron.** 2004. Laboratory detection of group B *Streptococcus* for prevention of perinatal disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **23**, :665-671.
127. **Bissonnette, L., and M. G. Bergeron.** 2006. Next revolution in the molecular theranostics of infectious diseases: microfabricated systems for personalized medicine. *Expert Rev Mol Diagn* **6**:433-450.
128. **Boivin, G., S. Cote, P. Dery, G. De Serres, and M. G. Bergeron.** 2004. Multiplex real-time PCR assay for detection of influenza and human respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* **42**:45-51.
129. **Ke, D., C. Menard, F. J. Picard, M. Boissinot, M. Ouellette, P. H. Roy, and M. G. Bergeron.** 2000. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. *Clin Chem* **46**:324-331.
130. **Lansac, N., F. J. Picard, C. Menard, M. Boissinot, M. Ouellette, P. H. Roy, and M. G. Bergeron.** 2000. Novel genus-specific PCR-based assays for rapid identification of *Neisseria* species and *Neisseria meningitidis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**:443-51.
131. **Martineau, F., F. J. Picard, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron.** 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **36**:618-23.
132. **Forbes, B. A., and K. E. Hicks.** 1996. Substances interfering with direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by PCR: effects of bovine serum albumin. *J Clin Microbiol* **34**:2125-2128.

133. **Ehricht, R., H. Hotzel, K. Sachse, and P. Slickers.** 2006. Residual DNA in thermostable DNA polymerases - a cause of irritation in diagnostic PCR and microarray assays (sous presse). *Biologicals*.
134. **Epstein, P. R.** 2004. Climate change and public health: emerging infectious diseases. *Encyclopedia Energy* 1:381-392.
135. **McNeill, W. H.** 1976. *Plagues and People*. Anchor Press-Press, New-York: 366 pages.
136. **Kellogg, C. A., and J. T. Lisle.** 2006. *Microbiology and Public Beach Safety: Integrated Science for the Protection of Public Health FS 2006-3045*. U.S. Department of the Interior.