

Institut national de la recherche scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Définition du profil de distribution de pathogènes responsables d'infections nosocomiales selon la niche écologique de l'environnement évier et la physico-chimie

Par
Alizée Monnier

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Frédéric Veyrier
Institut national de la recherche scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Examineur externe

Denis Roy
Département des sciences de l'agriculture et de
l'alimentation
Université Laval

Directeur de recherche

Éric Déziel
Institut national de la recherche scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Codirecteur de recherche

Philippe Constant
Institut national de la recherche scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur Éric Déziel de m'avoir fourni un projet de recherche passionnant ainsi que pour tout son soutien tout au long de ma maîtrise.

Je voudrais ensuite remercier mon co-directeur de recherche Philippe Constant pour sa patience et son investissement dans mon projet ainsi que pour tous les aspects qu'il m'a enseignés.

Je remercie grandement mes co-équipiers Marie-Ève Benoit et Thibault Bourdin qui m'ont beaucoup appris et sans qui l'expérience de ma maîtrise n'aurait pas été la même.

Je souhaiterais remercier Michèle Prévost, Émilie Bédard et Dominique Charron travaillant aussi sur le projet.

Un grand merci à Yves Fontaine qui s'est investi sans relâche dans les campagnes d'échantillonnage.

Finalement je remercie toute l'équipe de l'hôpital ayant fait l'objet de cet étude sans qui le projet n'aurait pas pu se dérouler.

RÉSUMÉ

Les infections nosocomiales résident en un problème majeur dans les unités de soins intensifs néonataux (USIN), en particulier chez les nouveau-nés prématurés. Étant un réservoir important de pathogènes opportunistes (POs), l'environnement évier des hôpitaux a souvent été identifié comme étant l'une des principales sources de transmission des infections nosocomiales. Par ailleurs, la niche écologique de l'environnement évier et les paramètres physico-chimiques de l'eau peuvent avoir une influence non négligeable sur le développement de ces PO. Les recherches effectuées dans le cadre de cette maîtrise se sont intéressées à caractériser la niche écologique de l'environnement évier et la physico-chimie de l'eau de l'USIN d'un hôpital de Montréal afin d'évaluer leur impact sur le développement de trois PO, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Stenotrophomonas maltophilia*. Ainsi, des corrélations intéressantes ont été obtenues entre la physico-chimie, les communautés bactériennes et l'occurrence des PO dans les éviers. Il a alors été possible de confirmer que, de tous les facteurs pouvant avoir un impact sur le développement des PO dans les réseaux d'eau, le principe d'exclusion de niche écologique et la physico-chimie étaient des paramètres non négligeables à prendre en compte pour expliquer le profil de distribution des PO.

ABSTRACT

Nosocomial infections are a major problem in neonatal intensive care units (NICUs), especially in preterm neonates. As an important reservoir of opportunistic pathogens (OPs), the hospital sink environment has often been identified as one of the main sources of nosocomial infections transmission. In addition, the ecological niche of the hospital sink environment and the physico-chemical parameters of the water can have a significant influence on the development of these OP. The research carried out in the context of this master's degree was aimed at characterizing the hospital sink environment and the physicochemical properties of water in the NICU of a Montreal hospital in order to assess their impact on the development of three OP, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Stenotrophomonas maltophilia*. Thus, interesting correlations have been obtained between physicochemical features of water, bacterial communities in the sink environment and the occurrence of OP in sinks. The results suggest that the niche exclusion mechanisms and physicochemical properties of water are drivers of OP distribution profile.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIÈRES.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv
1 INTRODUCTION	17
1.1 Mise en contexte.....	17
1.2 Hypothèse et objectifs de recherche	19
2 REVUE DE LITTÉRATURE	20
2.1 Les réseaux d'eau.....	20
2.1.1 Origine de la contamination des réseaux d'eau	20
2.1.2 Maladies provoquées par une contamination de l'eau potable.....	21
2.1.3 Pathogènes responsables de maladies hydriques et indicateurs d'une bonne qualité d'eau	21
2.1.4 Formation de biofilm.....	22
2.1.5 Mesures de traitements dans les réseaux d'eau	24
2.2 Infections nosocomiales	25
2.2.1 Infections nosocomiales dans les USIN.....	26
2.2.2 Mesures de contrôle des infections nosocomiales.....	27
2.3 Agents responsables des infections nosocomiales	28
2.3.1 Pathogènes opportunistes et résistance aux antibiotiques	29
2.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
2.3.3 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	30
2.3.4 <i>Serratia marcescens</i>	31
2.4 Diversité microbienne de l'environnement évier	32

3	MÉTHODOLOGIE	34
3.1	Campagne d'échantillonnage des Hôpitaux.....	34
3.1.1	Procédure d'échantillonnage	34
3.1.2	Analyses physico-chimiques.....	37
3.2	Analyses de laboratoire	37
3.2.1	Traitement des échantillons	37
3.2.2	Isolement des pathogènes opportunistes	39
3.3	Analyses moléculaires	39
3.3.1	Extractions d'ADN	39
3.3.2	Génotypage des pathogènes opportunistes par HiSST.....	40
3.3.3	PCR du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries et création des bibliothèques de séquençage.....	42
3.4	Traitement des résultats de séquençage	44
3.5	Analyses statistiques	45
4	RÉSULTATS	48
4.1	Physico-chimie de l'eau	48
4.2	Étude de l'occurrence des pathogènes d'intérêts dans l'environnement évier	49
4.3	DIVERSITÉ ALPHA	52
4.3.1	Analyse de la répartition des données.....	52
4.3.2	Étude de la distribution des indices de diversités selon le type d'échantillon	54
4.4	Diversité Bêta	55
4.4.1	Analyse du profil taxonomique	55
4.4.2	Étude de la relation entre la différence de diversité des échantillons et les facteurs susceptibles d'expliquer cette variation	57
4.4.1	Identification de genres bactériens spécifiques à un environnement donné	58
4.5	Étude de la relation des communautés bactériennes et des paramètres physico-chimiques	60
4.6	Étude de la dynamique de distribution des PO dans l'environnement évier selon la diversité bactérienne et la physico-chimie.....	61
4.6.1	Étude de la corrélation entre les indices de diversité alpha et l'occurrence des pathogènes dans les échantillons	61
4.6.2	Étude de la relation entre les PO d'intérêts et la diversité bêta	62

4.6.3	Étude de la relation entre les pathogènes et la physico-chimie.....	65
4.6.4	Explication du profil de distribution des pathogènes selon la communauté bactérienne et la physico-chimie	66
5	<i>DISCUSSION GÉNÉRALE</i>	68
6	<i>CONCLUSION</i>	75
<i>Annexe I</i>	<i>Volume des constituants du master mix de la PCR 16S</i>	<i>76</i>
<i>Annexe II</i>	<i>Paramètres de la réaction de PCR 16S</i>	<i>76</i>
<i>Annexe III</i>	<i>Volume des constituants de la PCR index</i>	<i>77</i>
<i>Annexe IV</i>	<i>Plan de répartition des amorces index sur une plaque 96 puits</i>	<i>77</i>
<i>Annexe V</i>	<i>Paramètres de la réaction de PCR index</i>	<i>78</i>
	<i>Bibliographie</i>	<i>79</i>

LISTE DES FIGURES

FIGURE 3-1 PLAN DES CHAMBRES ECHANTILLONNEES DANS L'USIN DE L'HOPITAL AYANT FAIT L'OBJET DE CETTE ETUDE	34
FIGURE 3-2 ÉCHEANCIER DE L'INSTALLATION DES DIVERS TRAITEMENTS DANS L'USIN DE L'HOPITAL AYANT FAIT L'OBJET DE CETTE ETUDE.....	36
FIGURE 3-3 ÉTAPES D'ECHANTILLONNAGE DE L'ENVIRONNEMENT EVIER.....	36
FIGURE 3-4 SCHEMA RECAPITULATIF DE LA PROCEDURE DU TRAITEMENT DES ECHANTILLONS	38
FIGURE 3-5 SCHEMA RECAPITULATIF DU GENOTYPAGE DES PO	42
FIGURE 3-6 SCHEMA RECAPITULATIF DE LA CREATION DES LIBRAIRIES DE SEQUENÇAGE	44
FIGURE 4-1 ACP PERMETTANT D'IDENTIFIER LES VARIABLES PHYSICO-CHIMIQUES DISTINGUANT AU MIEUX LES DIFFERENTS ENVIRONNEMENTS	49
FIGURE 4-2 PROPORTION DE POSITIVITE DES PATHOGENES D'INTERET SELON LA CHAMBRE ET LE TYPE D'ECHANTILLON	51
FIGURE 4-3 REPARTITION DES DONNEES DES DIFFERENTS INDICES ALPHA EN FONCTION DE LA CHAMBRE, DU TYPE D'ECHANTILLON ET DE LA DATE D'ECHANTILLONNAGE.....	53
FIGURE 4-4 REPRESENTATION DE LA DISTRIBUTION DES DIFFERENTS INDICES DE DIVERSITE EN FONCTION DU TYPE D'ECHANTILLON	54
FIGURE 4-5 REPRESENTATION DE L'ABONDANCE RELATIVE DES PRINCIPALES CLASSES BACTERIENNES RETROUVEES EN FONCTION DES ECHANTILLONS.....	56
FIGURE 4-6 ACoP METTANT EN EVIDENCE LA VARIATION DE LA DIVERSITE ENTRE LES ECHANTILLONS	57
FIGURE 4-7 IDENTIFICATION DE GENRES BACTERIENS SPECIFIQUES A UN ENVIRONNEMENT DONNE	59
FIGURE 4-8 DB-DRA ILLUSTRANT LA DYNAMIQUE DES ASV EN FONCTION DE LA PHYSICO-CHIMIE DE L'EAU.....	60
FIGURE 4-9 MATRICE DE CORRELATION ENTRE LES INDICES DE DIVERSITE ALPHA ET LES PO	62
FIGURE 4-10 DB-RDA ILLUSTRANT LA RELATION ENTRE LES PATHOGENES ET LA DIVERSITE BETA DES ECHANTILLONS	63
FIGURE 4-11 MATRICE DE CORRELATION ILLUSTRANT DE LA RELATION ENTRE LA PHYSICO-CHIMIE ET L'OCCURRENCE DES PO.....	66
FIGURE 4-12 DIAGRAMME DE VENN ILLUSTRANT LA CONTRIBUTION DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES (ASV), DE LA PHYSICO-CHIMIE ET DE LA COMBINAISON DES DEUX MATRICES POUR EXPLIQUER LE PROFIL DE DISTRIBUTION DES POS DANS LES EVIERS.....	67

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 3-1 PLAN D'ECHANTILLONNAGE EN FONCTION DE LA SEMAINE ET REPARTITION ALEATOIRE DES TRAITEMENTS DANS LES CHAMBRES	35
TABLEAU 3-2 MILIEUX DE CULTURE UTILISES POUR L'ISOLEMENT DES POS	39
TABLEAU 3-3 LOCI SPECIFIQUES CIBLES POUR CHAQUE PO SELON LA METHODE HISST	41
TABLEAU 4-1 PROPORTIONS DES EVIERS POSITIFS AU PATHOGENES AU COURS DU TEMPS	50
TABLEAU 4-2 TAUX D'OCCURRENCE DES POS SELON LE TYPE D'ECHANTILLON	51
TABLEAU 4-3 RESULTATS DE LA PERMANOVA REALISEE AU NIVEAU DE L'ENSEMBLE DES ECHANTILLONS ET PRENANT EN COMPTE A LA FOIS LE FACTEUR TYPE D'ECHANTILLON ET LE FACTEUR CHAMBRE.....	57
TABLEAU 4-4 RESULTATS DES PERMANOVAS REALISEE SUR DES COMPARAISON DEUX A DEUX ENTRE LES TYPES D'ECHANTILLONS	58
TABLEAU 4-5 IDENTIFICATION TAXONOMIQUE DES PRINCIPAUX ASVS IDENTIFIES PREALABLEMENT	64
TABLEAU 4-6 RESULTATS DES TESTS DE CORRELATION DE SPEARMAN REALISES SUR LES POS D'INTERETS ET LES DIFFERENTS ASVS IDENTIFIES PREALABLEMENT.....	65

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACoP	Analyse en Coordonnées Principales
ACP	Analyse en Composantes Principales
ANOVA	Analyse de la Variance
ASV	Variant de Séquence d'Amplicon
BD	Biofilm Drain
BF	Biofilm Faucet
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CF	Cuisine Familiale
db-RDA	Analyse de Redondance Basée sur la Distance
GH	Glycoside Hydrolase
HiSST	<i>High-Throughput Short Sequence Typing</i>
INRS-AFSB	Institut National de la Recherche Scientifique - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie
LL	Laboratoire de préparation du lait
NICU	<i>Neonatal intensive care unit</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PLM	Poste de Lavage des Mains
OP	Opportunistic Pathogen
PAVM	Pneumonie Associée à la Ventilation Mécanique
PERMANOVA	Analyse Multivariée Permutationnelle de la Variance
PO	Pathogène opportuniste
SA	Salle d'Allaitement
USIN	Unité de Soins Intensifs Néonatale
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
WD	Water Drain

WF

Water Faucet

1 INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

Les infections nosocomiales sont présentes dans le monde entier, que ce soit dans les pays développés ou en voie de développement. Ces dernières se contractent en milieu hospitalier et sont associées à une augmentation de la durée d'hospitalisation et du taux de mortalité, engendrant ainsi des pertes financières (Khan et al. 2017). Selon des études rapportées par l'OMS, plus de 1,4 millions de personnes dans le monde sont touchées par des infections nosocomiales. On rapporte que 10 % des patients hospitalisés dans les pays développés seraient sujets à la contraction de ces infections alors que ce taux peut atteindre jusqu'à 25 % dans les pays en voie de développement (World Health Organization 2006). Les personnes susceptibles de contracter une infection nosocomiale sont celles ayant un système immunitaire immunodéprimé, les personnes âgées ou encore les nouveau-nés, plus particulièrement ceux nés prématurément. En effet, l'incidence de contraction de ces infections est 3 à 20 fois plus élevée chez les nouveau-nés (Khan et al. 2017).

Par ailleurs, de nombreuses études ont révélé l'importance de l'impact des infections nosocomiales dans les unités de soins intensifs néonataux (USIN) (Lam et al. 2004, Aziz et al. 2005, Róžańska et al. 2015, Rangelova et al. 2020, Muyldermans et al. 2021). Dans les USIN, les infections nosocomiales possèdent des caractéristiques qui ne sont retrouvées dans aucune autre unité de soins et le taux de mortalité est l'un des plus élevés. En effet, ces dernières sont à l'origine de 50 % de décès chez les nouveau-nés prématurés âgés de moins de deux semaines (Al-Jabri et al. 2019, Rangelova et al. 2020). De nombreuses mesures de surveillance et de contrôle des infections nosocomiales ont déjà été mises en place mais ces dernières demeurent associées à un fort taux de morbidité et de mortalité, témoignant donc de la nécessité d'implanter des mesures supplémentaires dans les centres hospitaliers (Lam et al. 2004, Inweregbu et al. 2005, Al-Jabri et al. 2019, Muyldermans et al. 2021). Une multitude de micro-organismes sont à l'origine des infections nosocomiales et comprennent les bactéries, les virus et les parasites fongiques (Khan et al. 2015, Khan et al. 2017). Cependant, les bactéries opportunistes multi-résistantes aux antibiotiques sont responsables d'une grande majorité de ces infections. En effet, ces pathogènes ont la capacité d'acquérir des gènes de résistances par le biais de plusieurs mécanismes, rendant ainsi leur traitement compliqué (Xi et al. 2009, Vaz-Moreira et al. 2014, Khan et al. 2015).

Il existe plusieurs réservoirs de pathogènes opportunistes (PO) multi-résistants dont l'un non négligeable est l'environnement évier. En effet, cet environnement a été identifié à plusieurs reprises comme étant la source principale de transmission de PO (Dias et al. 2019, Pachori et al. 2019, Tang et al. 2020). Par ailleurs, le drain est connu pour être la composante de l'évier abritant une diversité variée de micro-organismes pouvant inclure de nombreux pathogènes (Gilbert et al. 2010, Lalancette et al. 2017, Muyldermans et al. 2021). La pression du jet d'eau au niveau du drain serait à l'origine de la formation

d'aérosols pouvant contenir des pathogènes et ainsi infecter les patients vulnérables (Gilbert et al. 2010). De plus, les matériaux des éviers et notamment des aérateurs pourraient favoriser la formation des biofilms dans les réseaux d'eau.

La niche écologique de l'environnement évier est un facteur important à prendre en compte dans le développement et le maintien des pathogènes. En effet, sa composition pourra favoriser ou non la survie du pathogène et son insertion dans un biofilm (Berry et al. 2006, Poitelon et al. 2009, Lu et al. 2013). La physico-chimie de l'eau peut avoir une réelle incidence sur la composition des communautés microbiennes de l'environnement évier et ainsi sur le développement de pathogènes (Torvinen et al. 2007, Tang et al. 2020, Zhou et al. 2021).

Les investigations menées durant cette maîtrise se sont inscrites dans un projet global visant à reconfigurer les éviers de trois USIN afin de limiter la propagation de PO en milieu hospitalier. Plusieurs acteurs sont intervenus au sein de ce projet, possédant chacun des rôles spécifiques. Polytechnique Montréal a été chargé, par le biais de diverses investigations, de choisir des modèles d'aérateurs et de désinfections des drains à implanter dans les hôpitaux (Benoit et al. 2021). Cependant, à la suite de la pandémie et à l'arrêt prématuré de l'échantillonnage les mesures correctives ont seulement pu être installées dans diverses chambres de l'USIN d'un centre hospitalier de la région de Montréal. L'échantillonnage a pu être effectué sur plusieurs semaines pendant lesquelles des échantillons environnementaux ont été recueillis. Ainsi, l'INRS-AFSB a été chargé d'effectuer un suivi de la niche écologique de l'environnement évier et de l'occurrence de trois PO étant régulièrement à l'origine de l'éclosion de foyers infectieux dans l'USIN étudiée ; *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Serratia marcescens*.

1.2 Hypothèse et objectifs de recherche

L'hypothèse générale de ce projet de maîtrise est qu'il existe une relation entre le profil de distribution des pathogènes dans les éviers et la structure des communautés microbiennes ainsi que la physico-chimie de l'eau de l'environnement évier. Afin de répondre à cette hypothèse, les recherches effectuées dans le cadre de ce projet se sont orientées autour de trois objectifs qui sont les suivants :

- 1- L'étude des paramètres physico-chimiques de l'environnement évier d'un hôpital de la région de Montréal
- 2- La caractérisation de la niche écologique de ce même environnement
- 3- La mise en lien de l'occurrence des pathogènes dans les éviers avec la structure des communautés microbiennes et la physico-chimie de l'eau

2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Les réseaux d'eau

Aujourd'hui, l'accès à une eau potable saine et propre est un aspect fondamental pour la qualité de vie humaine et réside donc dans l'une des priorités de la société (Sokolova et al. 2013, Forstinus et al. 2015, Benedict et al. 2017). Cependant, malgré les mesures de traitements d'eau, tous les pays au monde, développés ou en voie de développement sont touchés par des maladies liées à la qualité de l'eau potable (Sokolova et al. 2013, Forstinus et al. 2015, Shaw et al. 2015).

2.1.1 Origine de la contamination des réseaux d'eau

La contamination fécale des réseaux d'eau potable est l'une des principales causes de maladies hydriques (Sokolova et al. 2013, Forstinus et al. 2015, World Health Organization 2019). Selon l'OMS, environ deux milliards de personnes utilisent une source d'eau contaminée par des matières fécales, entraînant 485,000 décès chaque année (World Health Organization 2019, Smiech et al. 2020). Les sources de contaminations fécales sont multifactorielles, incluant notamment des facteurs environnementaux liés à des variations météorologiques tels que les variations de température et des épisodes de fortes pluies (Sokolova et al. 2013, Forstinus et al. 2015). Ces épisodes provoquent des rejets d'eaux usées des systèmes d'égouts qui deviennent surchargés par les eaux de ruissellement, conduisant alors à une propagation des agents pathogènes dans les eaux de surface qui augmente les risques de contamination de l'eau potable (Sokolova et al. 2013). En plus de moduler la fréquence des événements de précipitations et de sécheresse extrêmes, les changements climatiques exercent une réelle incidence sur le transport, le maintien et la prolifération des pathogènes dans l'environnement y compris dans les réseaux d'eau (Semenza et al. 2012, Prévost et al. 2013, Zlatanović et al. 2017). Une élévation de la température ambiante induite par le réchauffement climatique peut engendrer une augmentation des cycles de répllication de la majorité des pathogènes d'origine hydrique (Semenza et al. 2012). D'autres causes telles que la vétusté et la propreté des systèmes de distribution, la corrosion de la plomberie ou encore des défaillances des systèmes d'épuration peuvent avoir un rôle dans la contamination de l'eau potable (Simões et al. 2007, Torvinen et al. 2007, Semenza et al. 2012, Prévost et al. 2013). De plus, les matériaux des éviers, des aérateurs ou encore des drains peuvent favoriser ou non la formation de biofilms (Khan et al. 2015). Finalement, tous ces facteurs climatiques et structuraux définissent les propriétés des différentes composantes du réseau d'eau qui devient propice à la formation et à la succession de communautés microbiennes qui peuvent avoir un impact considérable sur la qualité de l'eau engendrant plusieurs effets indésirables tels qu'une dégradation des propriétés organoleptiques

de l'eau pouvant aller jusqu'à causer de sérieux problèmes au niveau de la santé humaine (Prévost et al. 2013, Roeselers et al. 2015, Shaw et al. 2015).

2.1.2 Maladies provoquées par une contamination de l'eau potable

Les maladies liées à l'eau potable sont généralement des maladies gastro-intestinales, dont la plus fréquente est la diarrhée, engendrant une déshydratation importante et pouvant entraîner la mort dans certains cas (Semenza et al. 2012, Forstinus et al. 2015, World Health Organization 2019). Un tiers des maladies gastro-intestinales serait d'origine hydrique et 4 % de la totalité du taux de mortalité dans le monde serait due à une contamination de l'eau potable (Hunter 1997, Prüss et al. 2002, Shaw et al. 2015). De plus, 4,1 % des cas de morbidité mondiale seraient d'origine diarrhéiques et 1,8 millions de personnes en décèderaient chaque année (Forstinus et al. 2015). Dans 88 % des cas, ces maladies seraient concentrées principalement chez les enfants dans les pays en voie de développement et causées par un manque d'approvisionnement en eau potable saine (Forstinus et al. 2015). Les maladies d'origine hydrique ne se limitent cependant pas à la diarrhée ; en effet, le choléra, la dysenterie amibienne, la cryptosporidiose, la giardiose, la salmonellose ou encore l'hépatite A sont des maladies pouvant être contractées via l'eau du robinet (Forstinus et al. 2015, World Health Organization 2019, Smiech et al. 2020). Des maladies pulmonaires, oculaires ou encore dermatologiques peuvent finalement être transmises par les réseaux d'eau et doivent être prises en compte sérieusement car elles constituent un risque majeur pour la santé surtout chez les personnes sensibles telles que les personnes âgées, les nouveau-nés et les personnes immunodéprimées (Semenza et al. 2012, Forstinus et al. 2015).

2.1.3 Pathogènes responsables de maladies hydriques et indicateurs d'une bonne qualité d'eau

Les maladies hydriques regroupent à la fois les maladies liées à une exposition directe à l'eau mais aussi celles résultant d'une exposition indirecte (Satnwell-Smith 2010, Forstinus et al. 2015). Ces dernières peuvent donc être transmises par ingestion directe de l'eau mais aussi par contact cutané avec l'eau ou encore par des vecteurs tels que les insectes (Satnwell-Smith 2010, Forstinus et al. 2015). Les micro-organismes responsables des maladies hydriques sont nombreux et peuvent être des virus, des bactéries, des protozoaires ou encore des parasites intestinaux (Satnwell-Smith 2010, Forstinus et al. 2015).

De 2013 à 2014, le centre de contrôle et de prévention des maladies (CDC) aux États-Unis a répertorié l'ensemble des épidémies d'origine hydrique (Benedict et al. 2017). Pendant cette période, il a été signalé par les responsables de la santé publique de 19 États que 42 épidémies d'origine hydrique avaient éclaté entraînant 1006 cas de maladies, 124 hospitalisations et 13 décès. Les agents responsables de ces épidémies ont été identifiés dans 98 % des cas et les bactéries appartenant au genre *Legionella* étaient à l'origine de 57 % des éclosions, 88 % d'hospitalisations et de 13 décès (Benedict et al. 2017). Par

ailleurs, huit épidémies ont été causées par des parasites dont 97 % étaient dues à *Cryptosporidium* (Benedict et al. 2017).

De nombreux indicateurs physiques et biologiques peuvent être utilisés pour évaluer la qualité de l'eau. Étant donné la multitude de pathogènes responsables de maladies liées à l'eau, il est très difficile d'évaluer la présence de chacun d'eux dans les systèmes de distribution d'eau ; d'autant plus que certains d'entre eux peuvent engendrer une maladie à très faible concentration (Forstinus et al. 2015). Cependant, la grande majorité des maladies hydriques étant dues à une contamination d'origine fécale, des bactéries indicatrices présentes dans les matières fécales sont utilisées afin d'évaluer la qualité de l'eau (Edberg et al. 2000, Forstinus et al. 2015). Les coliformes totaux composés d'un large groupe de bactéries appartenant aux entérobactéries peuvent être utilisés comme indicateur bactériologique. Puisque ceux-ci ne sont pas forcément d'origines fécales, les coliformes fécaux comme *Escherichia coli* sont préférentiellement utilisés (Edberg et al. 2000, Forstinus et al. 2015, Shaw et al. 2015). Outre la détection de microorganismes, l'évaluation de la concentration en nutriments comme l'ammoniac, le carbone organique, les nitrates et les nitrites peut être utilisée en tant qu'indicateur de qualité d'eau (Shaw et al. 2015). En effet, l'ammoniac est utilisé par les bactéries nitrifiantes afin de produire des nitrates et des nitrites et le carbone organique constitue une source nutritive grandement utilisée par un large éventail de bactéries. Finalement, les paramètres physico-chimiques de l'eau dont la température et le chlore sont également de bons indicateurs de la qualité d'eau en raison de leur rôle important au niveau de la présence et du maintien de pathogènes dans les réseaux d'eau (Zlatanović et al. 2017).

2.1.4 Formation de biofilm

Les biofilms sont une formation complexe de microorganismes entourés d'une matrice exopolymérique auto-produite attribuant aux bactéries de multiples avantages leur conférant une meilleure survie que les cellules planctoniques. Ces avantages incluent notamment un apport en nutriments, une protection contre les stress environnementaux ou encore une résistance aux antibiotiques (Stewart et al. 2001, Berry et al. 2006, Simões et al. 2007, Torvinen et al. 2007, Awoke et al. 2019). En effet, certaines études ont mis en avant le fait que les bactéries vivant sous forme de biofilm pouvaient être jusqu'à 1000 fois plus résistantes aux antibiotiques que ces mêmes bactéries sous forme planctoniques (Stewart et al. 2001, Awoke et al. 2019).

Aujourd'hui, de nombreuses études ont permis de démontrer l'impact de la formation de biofilm microbien sur la contamination des réseaux d'eau (Stewart et al. 2001, Simões et al. 2007, Awoke et al. 2019, El-Liethy et al. 2020). Les biofilms ont une forte capacité à se développer en milieu humide, tel que dans les réseaux d'eau, les robinets, les drains ou encore les pommeaux de douche (Stewart et al. 2001, El-Liethy et al. 2020). Des sections de biofilms peuvent se décrocher et se retrouver dans l'eau ; ainsi, de nombreuses personnes sont en contact avec des biofilms pouvant parfois être constitués de

pathogènes et donc représenter un risque pour la santé humaine (Williams et al. 2004, Berry et al. 2006, Poitelon et al. 2009, Awoke et al. 2019). C'est pourquoi il est nécessaire de s'efforcer de trouver des solutions afin de développer des méthodes permettant de limiter la formation de biofilms dans les réseaux d'eau. De plus, les infections à biofilms peuvent provoquer de sévères dommages même chez les personnes ayant un système immunitaire compétent, car les bactéries vivant sous forme de biofilm sont capables de persister dans le corps malgré les traitements pouvant être administrés (Stewart et al. 2001). En effet, des tests *in vitro* ont révélé qu'une concentration d'antibiotique grandement supérieure à la concentration minimale inhibitrice ($\times 1000$) était insuffisante pour tuer les bactéries adhérant en biofilm alors que les bactéries flottantes planctoniques relâchées par ce biofilm étaient éradiquées (Stewart et al. 2001).

La formation de biofilms dans les réseaux d'eau peut être influencée par une multitude de facteurs internes et externes tels que la température de l'eau, la disponibilité en nutriments, les matériaux des systèmes de distribution d'eau, la présence de désinfectant dans la plomberie ou encore les changements saisonniers (Hallam et al. 2001, Torvinen et al. 2007, Lu et al. 2013, Prévost et al. 2013, Zlatanović et al. 2017). De nombreuses études ont mis en évidence le rôle important du chlore dans les réseaux d'eau, avec une augmentation de formation de biofilms lorsque les concentrations de chlore étaient réduites (Hallam et al. 2001, Prévost et al. 2013, Zlatanović et al. 2017). En effet, le biofilm produit à une concentration de chlore de 0,05 mg/mL était deux fois plus important que celui produit à une concentration de chlore supérieure à 0,3 mg/mL soulignant ainsi l'importance du maintien d'un niveau de chlore convenable dans les réseaux d'eau (Hallam et al. 2001). Par ailleurs, l'OMS recommande une concentration de chlore libre de 0,2 mg/mL au point d'utilisation mais cette concentration est difficile à maintenir à cause des nombreux facteurs (température, stagnation...) pouvant provoquer la diminution de cette concentration (World Health Organization 2011). Cependant, même si le traitement au chlore permet de limiter la formation de biofilms, ces derniers parviennent tout de même à se développer dans les réseaux d'eau (Poitelon et al. 2009, Dias et al. 2019).

La stagnation de l'eau est un facteur favorable au développement de biofilms. En effet, l'une des principales causes de ce développement est que le désinfectant résiduel tel que le chlore ne peut plus effectuer son rôle inhibiteur de par sa disparition dans les réseaux d'eau due à la grande période de stagnation (Torvinen et al. 2007, Zlatanović et al. 2017, Bédard et al. 2018, Dias et al. 2019). De ce fait, lors de la première utilisation du robinet après une longue période de stagnation, le débit provoque le détachement des bactéries du biofilm qui s'étaient acclimatées à vivre sans stress dues à l'intensité du débit causant ainsi un premier jet d'eau avec une forte charge en bactéries (Bédard et al. 2018).

La température, pouvant être impactée par les changements saisonniers, a également un rôle remarquable sur la formation de biofilm en agissant soit directement sur la prolifération des pathogènes ou indirectement en abaissant la concentration de chlore dans les réseaux d'eau (Torvinen et al. 2007, Zlatanović et al. 2017). En effet, plus la température est élevée, plus la concentration du chlore tend à

diminuer favorisant ainsi le développement de biofilm (Torvinen et al. 2007). Des températures inférieures à 20 °C permettraient d'inhiber le développement de biofilm alors que des températures allant jusqu'à 45 °C auraient l'effet inverse (Rogers et al. 1994, Torvinen et al. 2007). De plus, certaines bactéries telles que *Legionella pneumophila* ont une capacité à survivre à des hautes températures (plus de 45 °C) lorsqu'elles sont en biofilm alors qu'elles sont incapables de se développer seules à des températures plus faibles (42 °C) (Rogers et al. 1994). Ces observations ne peuvent cependant pas être appliquées à l'ensemble des bactéries qui possèdent chacune leurs propres conditions optimales de croissance.

2.1.5 Mesures de traitements dans les réseaux d'eau

Dans les pays d'Amérique du Nord et de nombreux autres pays développés, des contrôles de qualité d'eau ont été imposés et des mesures de traitements d'eau ont été appliquées afin de réduire la contamination microbienne de l'eau et ainsi de fournir une eau potable saine aux consommateurs (Shaw et al. 2015, Benedict et al. 2017, Dias et al. 2019). Généralement, le traitement de l'eau implique une première étape consistant à réduire les contaminants et la matière organique par coagulation et la sédimentation puis d'éliminer les résidus solides restant par filtration. Finalement, une désinfection peut être effectuée par diverses méthodes, telles que par ajout d'oxydants chimiques (chlore, chloramine), par choc thermique ou encore par irradiations UV (Shaw et al. 2015). Au Québec et dans les autres pays développés, la désinfection recommandée et la plus utilisée dans les usines de traitement d'eau potable est celle par ajout de chlore ou de monochloramine (Williams et al. 2004, Shaw et al. 2015, USEPA 2015, Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques 2021). Le chlore aurait comme propriété d'être plus efficace contre les bactéries planctoniques alors que les monochloramines seraient plus compétentes pour pénétrer les biofilms et éradiquer ces derniers (Berger et al. 1992, Williams et al. 2004, Tang et al. 2020). Cependant, quelques problèmes résident dans l'utilisation du chlore pouvant produire des résidus potentiellement cancérigènes en interagissant avec la matière organique. Les résidus d'ammoniac issus de la désinfection aux chloramines peuvent quant à eux favoriser la croissance de bactéries hétérotrophes (Williams et al. 2004). De plus, tel que spécifié précédemment, le traitement a comme propriétés de modifier les communautés bactériennes et pourra donc favoriser ou non le développement de pathogènes (Lu et al. 2013, Dias et al. 2019).

Peu importe le désinfectant utilisé en première intention, celui-ci doit permettre l'irradiation de 99,99% des virus, des kystes de *Giardia* et des oocystes de *Cryptosporidium* (Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques 2021). Il est à noter que l'intensité des mesures de traitements sont à adapter à chaque système de distribution d'eau, qui ne requièrent pas tous le même niveau d'ajout de désinfectant (Shaw et al. 2015).

Par ailleurs, la désinfection de l'eau dans les usines de traitements n'est pas suffisante. En effet, le temps de trajet de l'eau de l'usine au point d'utilisation provoquera la diminution de la concentration du

désinfectant résiduel et son passage dans divers tuyaux pourra être à l'origine du décrochement du biofilm de la plomberie. Ainsi, le chlore résiduel au point d'utilisation sera insuffisant pour limiter le développement des micro-organismes. Cela pourra alors engendrer un développement de pathogènes dans les drains (offrant des conditions optimales de croissance) dans lesquels l'eau du robinet se déverse directement (Gilbert et al. 2010, Lalancette et al. 2017, Muyltermans et al. 2021). C'est pourquoi certaines études ont révélé qu'il pouvait être essentiel d'introduire une désinfection directement au point d'utilisation (Muyltermans et al. 2021). Certains ont expérimentés une désinfection des drains avec de l'hypochlorite à 10 %, d'autre avec de l'acide acétique à 25 % ou à 10 % et une désinfection physique par UV ou thermique peut aussi se révéler efficace (Giles et al. 2006, Smiech et al. 2020, Muyltermans et al. 2021). Par ailleurs, les désinfections chimiques ou physiques (UV) nécessitent au préalable une élimination de la turbidité car les particules en suspension provoquent une augmentation de la demande en chlore et peuvent protéger les micro-organismes de l'inactivation chimique ou physique et engendrer la formation de sous-produits de désinfection pouvant être nocifs (Léziart et al. 2019, Smiech et al. 2020). Cependant, la désinfection thermique se révèle être une alternative intéressante aux désinfections physiques et chimiques car celle-ci ne conduit pas à la formation de sous-produits de désinfection et présente un fort potentiel de pénétration des molécules qui ne peut être affecté par la turbidité et la présence de matière organique (Thornton et al. 2006, Smiech et al. 2020). Ainsi, cette dernière s'est avérée être très efficace contre les bactéries, les virus et les protozoaires, notamment contre ceux étant résistants au traitement chimique ou à l'irradiation (AL-Gheethi et al. 2013, Smelt et al. 2014, Smiech et al. 2020).

2.2 Infections nosocomiales

Les infections nosocomiales sont définies par l'institut national de santé publique du Québec comme étant « des infections acquises au cours d'un épisode de soins administrés par un établissement du réseau de la santé, quel que soit le lieu où ils sont administrés » (Institut national de santé publique du Québec 2021). Ces dernières peuvent concerner les patients, le personnel de santé ou encore les visiteurs (Khan et al. 2015, Murray et al. 2020). Le développement de symptômes n'est pas obligatoire pour une infection nosocomiale ; en effet, si des pathogènes sont retrouvés dans des sites ou des fluides corporels stériles comme le sang ou le liquide cérébro-spinal, l'infection sera qualifiée de nosocomiale même sans l'apparition de symptômes (Khan et al. 2015, Murray et al. 2020). Cependant, certaines infections ne peuvent pas être considérées comme nosocomiales si ces dernières étaient présentes au moment de l'admission, même si elles sont exposées à des complications (Khan et al. 2015).

Les infections nosocomiales sont devenues fortement problématiques avec l'utilisation intensive des antibiotiques ; résultant en une morbidité et une mortalité élevée ; surtout dans les pays en développement regroupant 75 % des infections nosocomiales (Khan et al. 2015). Les individus les plus à risques sont ceux ayant un système immunitaire immunodéprimé, les nouveau-nés, les personnes âgées

et les patients présents dans des unités de soins intensifs fréquemment sujets à l'utilisation de pratiques invasives telles qu'une assistance ventilatoire ou encore la cathétérisation du système urinaire (Pachori et al. 2019).

2.2.1 Infections nosocomiales dans les USIN

Les unités de soins intensifs néonataux (USIN) sont des unités d'hôpitaux où les patients sont des nouveau-nés requérant une attention et des soins médicaux particuliers. À titre d'exemple, ces derniers peuvent être prématurés, souffrir d'hypoglycémie ou encore présenter des problèmes respiratoires (Al-Jabri et al. 2019). Étant une importante cause de morbidité et de mortalité, les infections nosocomiales représentent un problème majeur dans les USIN, en particulier chez les nouveau-nés présentant un faible poids à la naissance (< 1500 g) et chez les prématurés nés avant la 37^{ème} semaine de gestation (Lam et al. 2004, Aziz et al. 2005, Róžańska et al. 2015, Rangelova et al. 2020, Muyldermans et al. 2021). Aux États-Unis plus de 300 000 nouveau-nés sont admis en USIN chaque année (Al-Jabri et al. 2019). Le taux d'infections nosocomiales contractées dans les USIN est l'un des plus élevés, même s'il réside une différence entre les pays développés et en voie de développement (Nagata et al. 2002, Rangelova et al. 2020). En effet, environ un million de nouveau-nés décèdent chaque année suite à la contraction d'une infection et les infections nosocomiales sont à l'origine du décès de 50 % des nouveau-nés âgés de moins de deux semaines dans les USIN (Al-Jabri et al. 2019, Rangelova et al. 2020). Les principales infections nosocomiales contractées dans les USIN sont celles liées au sang, les pneumonies et les entérocolites nécrosantes (Sokolova et al. 2013, Rangelova et al. 2020).

Les patients des USIN sont fortement prédisposés à contracter des infections nosocomiales de par la faible capacité de défense de leur système immunitaire (Nagata et al. 2002, Lam et al. 2004, Aziz et al. 2005, Rangelova et al. 2020). De plus, leur état de santé générale nécessite la plupart du temps des traitements par administration d'antibiotiques, des pratiques invasives (cathéter intraveineux, ventilation mécanique, intubation...) et une hospitalisation prolongée qui contribuent à augmenter les risques de contracter une infection nosocomiale pour les nouveau-nés (Lam et al. 2004, Aziz et al. 2005, McCoy et al. 2012, Róžańska et al. 2015, Rangelova et al. 2020, Muyldermans et al. 2021). Par ailleurs, la proximité des patients dans certaines USIN ainsi que les contacts avec les mains de l'ensemble du personnel hospitalier représentent une source considérable de transmission de PO (Lam et al. 2004, Rangelova et al. 2020).

Un facteur non négligeable permettant de prédire si un nouveau-né sera particulièrement prédisposé à contracter une infection est son poids à la naissance. En effet, le risque d'infection est inversement proportionnel au poids de naissance du nouveau-né (Goldmann 1989, Van der Zwet et al. 2005, Rangelova et al. 2020). Une réduction du poids de 500 g à la naissance serait associée à une augmentation de 3 % du risque de contracter une infection, particulièrement pour les groupes de nourrissons présentant un poids entre 750 et 999 g (Nagata et al. 2002, Róžańska et al. 2015, Rangelova

et al. 2020). Une différence majeure réside dans le taux d'acquisition d'infections nosocomiales entre les groupes de nouveau-nés présentant un très faible poids à la naissance et ceux avec un poids faible à normal. En effet, le taux d'incidence des infections nosocomiales serait de 6,7 % à 74,5 % chez les nouveau-nés extrêmement prématurés et de 0,1 % à 17 % chez les nouveau-nés légèrement prématurés ou nés à terme (Rangelova et al. 2020). Le diagnostic des infections nosocomiales est plus compliqué chez les nouveau-nés que chez un autre groupe de patients, pouvant ainsi expliquer les variations d'incidence au sein d'un même groupe de patients entre différentes USIN. En effet, la faible spécificité de leurs symptômes, la difficulté de prélever les éléments nécessaires au diagnostic (sang, LBA...) et les méthodes différant d'une USIN à une autre peuvent être à l'origine de ces variations (Van der Zwet et al. 2005, Rangelova et al. 2020).

2.2.2 Mesures de contrôle des infections nosocomiales

L'étude de l'efficacité du contrôle des infections nosocomiales a démontré que l'utilisation de mesures de préventions minimales permettaient d'éviter 6 % d'entre elles et que 32 % de toutes ces infections pouvaient être évitées grâce à des mesures adaptées, contrôlées et efficaces (Haley et al. 1985, Inweregbu et al. 2005, Rangelova et al. 2020). Ces dernières reposent sur des méthodes de surveillance, de stratégies de prévention et des programmes de traitements nécessitant une connaissance approfondie des agents pathogènes et la reconnaissance de l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques (Haley et al. 1985, Inweregbu et al. 2005, Al-Jabri et al. 2019). La surveillance correspond à « la collecte, l'analyse et l'interprétation continues et systématiques des données de santé essentielles à la planification, à la mise en œuvre et à l'évaluation des pratiques de santé publique, étroitement intégrées à la diffusion en temps opportun de ces données à ceux qui ont besoin de savoir » (Inweregbu et al. 2005, Khan et al. 2015). Cela permet alors à chaque hôpital d'établir au mieux une stratégie rapide et efficace visant à réduire les infections nosocomiales. Les mesures de préventions consistent à identifier l'ensemble des facteurs rendant un patient plus susceptible de contracter une infection nosocomiale tel que le tabagisme, les transfusions sanguines, l'obésité ou encore, pour les nouveau-nés, l'ensemble des caractéristiques liés à leur naissance et à leur hospitalisation. Par ailleurs, une mauvaise hygiène des mains est responsable de 40 % des infections transmises dans les hôpitaux (Inweregbu et al. 2005) et la mise en place d'un plus grand nombre de poste de lavage de mains et gel hydro alcoolique tend à réduire le risque d'infections nosocomiales (Lam et al. 2004, Inweregbu et al. 2005, Al-Jabri et al. 2019). D'autres mesures ont notamment été mises en place auprès du personnel telles que (Lam et al. 2004, Inweregbu et al. 2005, Al-Jabri et al. 2019, Muyldermans et al. 2021) :

- La formation des professionnels de santé (infirmière, médecin, aide-soignante...)
- Le port de vêtement de protection obligatoire pour le personnel de la santé exposé à des liquides organiques (sang, urine, transpiration...)
- Des gants et des tabliers doivent être portés pour la manipulation de fluides corporels

- Le lavage des mains après le port de gants
- Des guides pour la stérilisation et la désinfection des dispositifs médicaux

Un facteur important à prendre en compte pour la réduction des infections nosocomiales est une utilisation appropriée des antibiotiques nécessitant une connaissance absolue de leur fonctionnement (Inweregbu et al. 2005). Par exemple, la diminution d'administration d'antibiotiques à large spectre et l'antibiothérapie rotationnelle permettrait de diminuer de manière importante les infections nosocomiales. La thérapie rotationnelle consiste à retirer un antibiotique ou une classe d'antibiotique dans une unité de soin pendant une courte période afin d'éviter une pression de sélection trop importante sur les bactéries et donc l'émergence d'une résistance (Inweregbu et al. 2005).

2.3 Agents responsables des infections nosocomiales

Les infections nosocomiales sont causées par une multitude de pathogènes mais 90 % d'entre eux sont des bactéries (Khan et al. 2015). Les bactéries à Gram positifs sont responsables de la majorité des infections nosocomiales dans les USIN (70 %) et *Staphylococcus* spp. en sont les principaux agents responsables (Rangelova et al. 2020). Cependant, les bactéries à Gram positif ne sont pas les seules représentant un danger. En effet, les bactéries à Gram négatif ont un impact à ne pas négliger étant donné qu'elles seraient responsables de 19 % des septicémies et de 30 % des pneumonies contractées en milieu hospitalier (Rangelova et al. 2020). Parmi les principaux pathogènes responsables d'infections nosocomiales sont retrouvés *Streptococcus* spp., *Legionella pneumophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* ou encore *Serratia marcescens* (Gilbert et al. 2010, Khan et al. 2015). Par ailleurs, le ministère de la santé et des services sociaux du Québec a identifié *Clostridium difficile*, les Entérocoques Résistants à la Vancomycine, *Staphylococcus Aureus* Résistant à la Méthicilline et les bacilles à Gram négatif producteurs de carbapénémases comme étant actuellement les bactéries nécessitant une attention particulière au regard de la contraction d'infections nosocomiales (Ministère de la santé et des services sociaux du Québec 2018).

Les microorganismes responsables des infections nosocomiales ont la capacité de contaminer à plusieurs reprises l'environnement du patient tel que les différents types de surfaces (poreuses ou lisses) ainsi que les environnements humides (eau du robinet, douche ...) (Al-Jabri et al. 2019). Par la suite, les pathogènes présents dans ces environnements auront la capacité d'infecter le patient, soit par contamination directe soit par contamination indirecte (personnels hospitaliers, visiteurs ...) (Al-Jabri et al. 2019).

2.3.1 Pathogènes opportunistes et résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un phénomène pouvant se manifester chez des bactéries retrouvées à la fois dans les milieux naturels et anthropisés (Vaz-Moreira et al. 2014). Cependant, au cours des 70 dernières années, la résistance aux antibiotiques s'est particulièrement développée à un niveau inquiétant chez des pathogènes opportunistes par l'utilisation inadaptée et excessive d'antibiotiques à large de spectre. Cette résistance accrue a entraîné une augmentation considérable du nombre d'infections nosocomiales résistantes aux antibiotiques (Xi et al. 2009, Vaz-Moreira et al. 2014, Khan et al. 2015). Par ailleurs, les unités de soins intensifs des hôpitaux sont des lieux les plus propices au développement de résistances principalement dues à une forte pression de sélection dans ces environnements (Pachori et al. 2019). De plus, certaines études ont pu démontrer que l'usage de désinfectant dans l'eau potable (principalement le chlore) pouvait jouer un rôle dans l'acquisition de gènes de résistance chez les bactéries, par exemple en favorisant la production de pompes à efflux mais ces mécanismes restent encore très peu connus (Xi et al. 2009, Vaz-Moreira et al. 2014). En effet, la concentration de bactéries est moins importante dans une eau ayant été traitée mais il a cependant été observé que la proportion de gènes codant pour la résistance de certains antibiotiques tels que l'amoxicilline, la rifampine et le chloramphenicol avait considérablement augmenté, et ce, plus particulièrement dans une eau traitée au chlore (Xi et al. 2009). L'émergence de cette résistance affecte de manière considérable la santé humaine et constitue donc un problème de santé publique (Xi et al. 2009, Meletis et al. 2012).

Par ailleurs, la présence de PO dans les réseaux d'eau des hôpitaux est aujourd'hui une préoccupation majeure de santé publique car celle-ci peut engendrer de sérieux problèmes de santé chez les personnes susceptibles de contracter une infection nosocomiale (Dias et al. 2019, Pachori et al. 2019, Tang et al. 2020). En effet, les drains des éviers sont colonisés par de nombreuses bactéries constituant ainsi un réservoir de PO (Gilbert et al. 2010). Il existe différents modes de transmission des pathogènes par l'eau : la transmission directe par aérosol, la transmission indirecte par des vecteurs passifs tels que du matériel de soin ayant été en contact avec l'eau ou encore la transmission par les mains du personnel ou des visiteurs ayant été en contact avec l'eau contaminée (Decker et al. 2014).

2.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Les contaminations par le genre *Pseudomonas* sont considérées aujourd'hui comme étant un véritable enjeu de santé publique (Meletis et al. 2012). En effet, certaines espèces de ce genre et particulièrement *P. aeruginosa* sont des PO pouvant provoquer de sérieux problèmes au niveau de la santé humaine (Meletis et al. 2012, Pachori et al. 2019).

P. aeruginosa est une bactérie à Gram négatif aérobie et non fermentaire appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae* (Pachori et al. 2019). De par sa production de deux pigments, la pyoverdine (jaune-verte) et la pyocyanine (bleu-vert), *P. aeruginosa* est une bactérie facilement identifiable par culture (Pachori et al. 2019). Cependant, il existe de nombreuses souches cliniques ne produisant pas ces

pigments. Celle-ci représente 11 % des infections nosocomiales (de Bentzmann et al. 2011, Khan et al. 2015, Pachori et al. 2019) et ses sites d'infections multiples sont les reins, le système digestif, les voies urinaires et les voies supérieures du système respiratoire (Khan et al. 2015, Pachori et al. 2019). En effet, *P. aeruginosa* est à l'origine de nombreuses maladies telles que des septicémies, des conjonctivites, des endophtalmies, des pneumonies ou encore des infections urinaires (Awoke et al. 2019, Pachori et al. 2019, Rangelova et al. 2020). De plus, cette dernière est associée à un fort taux de mortalité, particulièrement chez les nouveau-nés prématurés où elle engendre principalement des pneumonies associées à la ventilation mécanique (PAVM) (Pachori et al. 2019, Rangelova et al. 2020).

P. aeruginosa, comme de nombreuses espèces représentatives de son genre, nécessite très peu de nutriments pour survivre et se développer et est capable d'utiliser une grande variété de sources de carbone et d'énergie pour combler ses besoins nutritifs (Pachori et al. 2019). Les sources de contamination de *P. aeruginosa* sont donc multiples de par son adaptabilité à de nombreux environnements parmi lesquels sont retrouvés les surfaces sèches, l'eau potable, tire-laits, les incubateurs, les mains du personnel, les distributeurs de savons ou encore les systèmes de ventilation mécaniques (Meletis et al. 2012, Khan et al. 2015, Pachori et al. 2019, Rangelova et al. 2020). De plus, en raison de sa forte adaptabilité, cette dernière a la capacité de survivre sur des surfaces sèches inanimées de six heures à six mois (Pachori et al. 2019). Par ailleurs, il est à noter que 30 % à 50 % des infections nosocomiales impliquant *P. aeruginosa* sont causées par une contamination des unités de soins intensifs (Tang et al. 2020) et d'autres investigations ont permis d'identifier les aérateurs et les drains comme une de ses sources d'infections (Bédard et al. 2015).

Les infections à *P. aeruginosa* sont de plus en plus difficiles à gérer du fait de sa résistance à un grand nombre d'antibiotiques. En effet, cette dernière possède premièrement une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques mais elle est aussi capable d'acquérir quasiment tous les mécanismes de résistance connus à ce jour (Meletis et al. 2012, Pachori et al. 2019, Rangelova et al. 2020). Ces mécanismes, naturels ou induits, peuvent résider en une faible perméabilité de la membrane des membres de cette espèce, l'activité de pompes à efflux, la restriction de l'absorption et la modification de médicaments ainsi que la modification des cibles des antibiotiques (Meletis et al. 2012, Khan et al. 2015, Pachori et al. 2019). L'ensemble de ces mécanismes rendent alors la bactérie résistante aux céphalosporines, au triméthoprime, aux macrolides, au chloramphénicol, aux tétracyclines et aux fluoroquinolones (Khan et al. 2015, Pachori et al. 2019).

2.3.3 *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia est une bactérie à Gram négatif, non fermentaire, motile et aérobie stricte appartenant à la famille des *Xanthomonadaceae* (Verweij et al. 1998, Falagas et al. 2009, Brooke 2012). Elle est un PO émergent, multi résistant aux antibiotiques étant associé à un taux de mortalité élevé chez les personnes immunodéprimées (Verweij et al. 1998, Abbassi et al. 2009, Falagas et al. 2009, Brooke

2012). Cette bactérie est retrouvée dans les environnements aqueux tels que l'eau du robinet, les humidificateurs, les équipements d'assistance ventilatoire, les aliments, les animaux et les fèces humains (Verweij et al. 1998, Abbassi et al. 2009, Brooke 2012). Dans le milieu hospitalier, *S. maltophilia* a été isolée dans de nombreux environnements évier notamment au niveau des drains (Verweij et al. 1998, Brooke 2012). Par ailleurs, le genre *Stenotrophomonas* a été identifié comme étant l'un des plus communs retrouvés dans les USIN (Hewitt et al. 2013).

Les infections à *S. maltophilia* concernent une multitude d'organes et de tissus. En effet, cette dernière cause principalement des infections au niveau des voies respiratoires, mais est aussi associée à des bactériémies, des septicémies, des méningites ou encore des infections des voies urinaires, des os ou des tissus mous (Abbassi et al. 2009, Falagas et al. 2009, Brooke 2012). Une des principales caractéristiques de cette bactérie est sa capacité d'adhérer aux matériaux, et donc d'engendrer la formation de biofilms, notamment dans les systèmes de distribution d'eau (Brooke 2012). La transmission des infections à *S. maltophilia* se produit principalement par contact avec la source, mais il a été démontré que les mains du personnel hospitalier étaient un important vecteur dans les unités de soins intensifs (Brooke 2012).

En plus d'être retrouvée dans de nombreux environnements et d'avoir le pouvoir d'infecter plusieurs organes et tissus, cette bactérie présente une résistance à un large spectre d'antibiotiques incluant plusieurs mécanismes de résistances (Verweij et al. 1998, Falagas et al. 2009, Brooke 2012, Gröschel et al. 2020). En effet, cette dernière possède une membrane peu perméable, des pompes à efflux et des enzymes modifiant les antibiotiques lui conférant une résistance à de nombreux antibiotiques tels que les β -lactamines, les macrolides, les céphalosporines, les fluoroquinolones, les aminosides, les carbapénèmes, le chloramphénicol, les tétracyclines et les polymyxines (Abbassi et al. 2009, Brooke 2012, Gröschel et al. 2020).

2.3.4 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* ; provoquant des maladies chez les plantes et plusieurs hôtes invertébrés et vertébrés mais elle est surtout un PO multi-résistant aux antibiotiques causant de nombreuses infections nosocomiales (Kurz et al. 2003, Williams et al. 2004, Maragakis et al. 2008, Sandner-Miranda et al. 2018, Rangelova et al. 2020, Muyldermans et al. 2021). En effet, *S. marcescens* compte parmi les dix agents pathogènes les plus retrouvés dans les hôpitaux à l'échelle mondiale (Mahlen 2011, Sandner-Miranda et al. 2018). Les principaux foyers d'infections de *S. marcescens* sont les voies respiratoires et urinaires ainsi que le tractus gastro-intestinal et le sang (Giles et al. 2006, Sandner-Miranda et al. 2018, Şimşek 2019). Ce pathogène est à l'origine de nombreux cas de pneumonies, de méningites, de bactériémies et du système nerveux central ainsi que des infections urinaires et des conjonctivites (Maragakis et al. 2008, Sandner-Miranda et al. 2018, Rangelova et al. 2020). De par sa haute capacité à coloniser ses hôtes, *S. marcescens* créer des foyers infectieux pouvant entraîner un taux de mortalité élevé, plus particulièrement chez les

nouveau-nés prématurés (Maragakis et al. 2008, Şimşek 2019, Rangelova et al. 2020, Muyldermans et al. 2021).

S. marcescens a la capacité de se développer dans de nombreux environnements, principalement humides tels que les tire-laits, le lait maternel, les climatiseurs, le savon, les désinfectants ou encore l'eau du robinet et les drains (Maragakis et al. 2008, Sandner-Miranda et al. 2018, Muyldermans et al. 2021). De plus, *S. marcescens* a la capacité de vivre sur la peau sur de longues périodes facilitant alors la transmission de cette dernière d'un hôte à un autre (Maragakis et al. 2008). En effet, dans une étude menée par Muyldermans et al. (2021), les drains étaient l'une des sources principales de contamination des nouveau-nés par *S. marcescens*. Cependant, il a été élucidé que les nourrissons n'avaient pas pu se contaminer de manière directe par le drain, l'explication la plus probable résidait donc dans le fait que la transmission avait été effectuée par les mains du personnel hospitalier ou des parents (Muyldermans et al. 2021).

Les cas d'épidémies à *S. marcescens* sont principalement causées par des souches multi résistantes possédant une résistance intrinsèque. De plus, étant donné que la transmission de gènes de résistance d'une souche à une autre est très facile pour cette bactérie, la mise en place de mesures rigoureuses de contrôle des infections dans les hôpitaux sont indispensables pour parvenir à maîtriser les épidémies à *S. marcescens* (Muyldermans et al. 2021). L'administration de traitements contre *S. marcescens* est un enjeu car celle-ci possède une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques et est capable de produire des β -lactamases la rendant ainsi résistante aux β -lactamines, un groupe d'antibiotique couramment utilisé pour traiter les infections bactériennes (Şimşek 2019). *S. marcescens* est aussi souvent résistante aux antibiotiques du groupe des aminoglycosides, des quinolones, des macrolides et des polypeptides antimicrobiens (Sandner-Miranda et al. 2018, Şimşek 2019). Les nouveau-nés, particulièrement ceux nés prématurément peuvent donc être colonisés pendant une longue période par *S. marcescens*, malgré l'administration des bons traitements antimicrobiens, en particulier si celle-ci a colonisé les tractus respiratoires et gastro-intestinaux (Muyldermans et al. 2021).

2.4 Diversité microbienne de l'environnement évier

Les habitats d'eau douce regroupant les eaux de surface, l'eau potable, l'eau minérale et les eaux usées comportent généralement des communautés microbiennes dominées par quatre embranchements soit les Protéobactéries, les Actinobactéries, les Bactéroïdes et les Firmicutes (Vaz-Moreira et al. 2014). À des rangs taxonomiques inférieurs comme au niveau des genres et espèces les différents types d'eau énumérés précédemment peuvent avoir une diversité différente mais il existe certains genres tels que *Sphingomonas*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* ou encore *Clostridium* qui sont ubiquitaires et donc retrouvés dans tous les types d'eau douces (Vaz-Moreira et al. 2014). Cependant, la diversité bactérienne est propre à chaque système de distribution d'eau et varie selon le type de désinfectant utilisé pour traiter l'eau, les matériaux de la plomberie, le temps de résidence de l'eau, la

disponibilité en nutriments et la matière organique présente dans les réseaux d'eau (Lu et al. 2013, Vaz-Moreira et al. 2014, Roeselers et al. 2015, Dias et al. 2019). Dans les eaux potables chlorées (traitement principalement utilisé), le groupe identifié étant principalement abondant est celui des Protéobactéries (50 % à 72 %) regroupant les classes des Alpha protéobactéries, des Bêta protéobactéries et des Gamma protéobactéries dont une prédominance des Alpha protéobactéries a été remarquée (Poitelon et al. 2009, Lu et al. 2013, Vaz-Moreira et al. 2014, Dias et al. 2019). Dans les systèmes d'eau non chlorées, les Protéobactéries sont généralement toujours prédominantes, cependant, la baisse du taux de chlore dans les réseaux d'eau serait associée à une diminution de la proportion d'Alpha protéobactéries dans ces derniers ainsi qu'à une augmentation de Bêta protéobactéries (Berry et al. 2006, McCoy et al. 2012, Dias et al. 2019).

L'utilisation d'approches non-dépendantes de cultures est indispensable pour analyser la niche écologique d'un environnement. D'une part, moins de 1 % des bactéries présentes dans l'eau sont cultivables, une approche moléculaire tel qu'un séquençage à haut débit est donc préférable pour l'analyse de la niche écologique d'un environnement aqueux en ciblant le gène codant l'ARNr 16S (Poitelon et al. 2009, Lu et al. 2013, Vaz-Moreira et al. 2014, Roeselers et al. 2015). En second lieu, seule l'approche indépendante de la culture permet le traitement de grands nombres d'échantillons étant essentiels pour définir la niche écologique des microorganismes d'intérêt. Le progrès fulgurant des technologies de séquençage ainsi que des outils bioinformatiques durant la dernière décennie ont d'ailleurs contribué à la prise de conscience de l'importance des interactions microbiennes et de la flexibilité physiologique en réponse aux fluctuations du milieu. Des approches combinant l'isolement de souches d'intérêt et le profilage génomique par des outils de séquençage sont donc incontournables en écologie microbienne.

L'écologie microbienne de l'environnement évier est un aspect important à considérer dans les réseaux de distribution car la composition de la niche écologique influencera la formation de biofilm, la corrosion des systèmes de distribution d'eau, la nitrification et la croissance et le maintien des pathogènes dans l'eau (Poitelon et al. 2009). En effet, certaines études ont pu mettre en avant le fait qu'une communauté de biofilm riche en diversité était généralement plus résistante au stress, offrant ainsi une protection optimale aux pathogènes présents au sein de cette communauté (Berry et al. 2006, Lu et al. 2013). C'est pourquoi une compréhension optimale de la hiérarchisation des communautés microbiennes dans l'eau offre des perspectives prometteuses pour le développement de mesures de traitements et de contrôles de qualité d'eau (Berry et al. 2006, Lu et al. 2013).

3 MÉTHODOLOGIE

3.1 Campagne d'échantillonnage des Hôpitaux

3.1.1 Procédure d'échantillonnage

Dans le cadre de ce projet, l'environnement évier de l'USIN d'un hôpital de la région de Montréal a été étudié (Figure 3-1). Un total de vingt éviers a été échantillonné, à raison de dix par semaine pendant deux mois durant l'hiver 2020. Ces éviers étaient localisés dans seize chambres simples différentes ainsi que dans la salle d'allaitement (SA), la cuisine mise à disposition pour les familles des nouveau-nés (CF), le laboratoire de préparation du lait maternisé (LL) et le poste de lavage des mains situés à l'entrée de l'USIN (PLM).

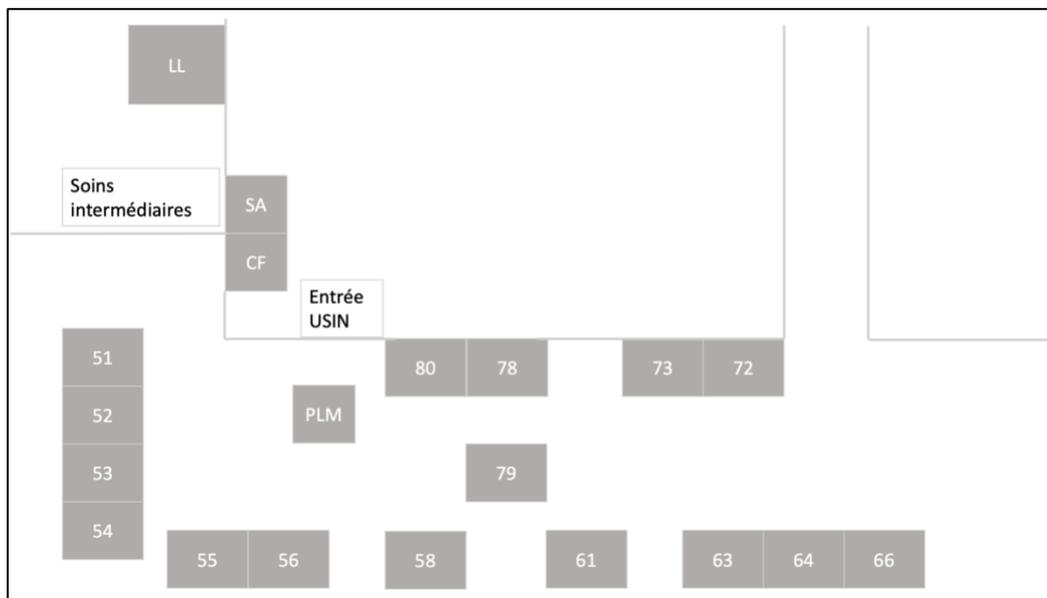


Figure 3-1 Plan des chambres échantillonnées dans l'USIN de l'hôpital ayant fait l'objet de cette étude

Quatre traitements comportant quatre répétitions ont été appliqués aléatoirement dans seize chambres. Ces traitements consistaient en diverses options d'ingénierie des éviers choisis en fonction de leurs performances évaluées par des chercheurs de Polytechnique Montréal (aérosols, biofilms) (Benoit et al. 2021). Parmi l'ensemble des vingt éviers, les traitements étaient donc représentés par quatre éviers avec un drain auto-désinfectant (KLEANIK™ Sink Disinfection System), quatre éviers avec désinfection thermique (installation de valves), quatre éviers avec un nouvel aérateur et quatre éviers sans interventions servant de témoins (Tableau 3-1). Les quatre éviers hors chambres n'ayant reçu aucune intervention ont également été inclus dans les suivis.

Tableau 3-1 Plan d'échantillonnage en fonction de la semaine et répartition aléatoire des traitements dans les chambres

	Numéro de chambres (semaines impaires)	Numéro de chambres (semaines paires)
Désinfection thermique	52 – 64 – 79	51
Drain auto-désinfectant	56	58 – 66 – 78
Nouvel aérateur	54 – 63 – 80	61
Témoin	55 – CF – SA	53 – 72 – 73 – LL – PLM

Tous les traitements n'ont pas été installés dès le début de l'échantillonnage. En effet, un seul drain auto-désinfectant avait été installé en amont de la campagne d'échantillonnage, les autres drains auto-désinfectant ainsi que les vannes de drains pour la décontamination thermique ont été installés à la 6^{ème} semaine d'échantillonnage et les aérateurs ont quant à eux été installés à la 7^{ème} semaine (Figure 3-2).

Le drain auto-désinfectant fonctionnait par cycle, ce dernier permettait en premier lieu une désinfection thermique en chauffant l'eau à 85 °C puis dans un second temps un nettoyage à l'aide de vibration permettant ainsi de déloger et d'éviter la formation de biofilm. La procédure de désinfection thermique pour les drains à valve se déroulait de la façon suivante ; dans un premier temps le drain était rincé à l'eau chaude du robinet pour 30 secondes. Ensuite, environ 500 mL d'eau à plus de 90 °C (amené à cette température à l'aide d'une bouilloire) étaient versés dans le drain afin d'éliminer les résidus d'eau du siphon. Finalement, le reste de l'eau chaude était ajouté dans le drain, après avoir fermé la vanne, jusqu'à ce que cette dernière atteigne le haut de la crépine, puis un bouchon en caoutchouc était déposé sur la crépine afin de minimiser la perte de chaleur. Le tout était laissé à agir pour une durée de 30 minutes puis la vanne était ouverte afin de permettre l'évacuation de l'eau.

L'échantillonnage, qui devait se poursuivre sur une période d'un an a été interrompu après la 9^{ème} semaine d'activité en raison de l'inaccessibilité des installations causée par les mesures sanitaires entourant la pandémie de la COVID-19. De ce fait, le suivi des mesures de traitements implantés n'a pas pu être effectué dans cette étude car ces dernières ont été mises en place seulement trois semaines avant l'arrêt des activités, représentant ainsi un seul échantillonnage complet (comprenant l'ensemble des vingt éviers échantillonnés) (Figure 3-2). L'impact des traitements ne sera donc pas pris en compte dans l'analyse des résultats de ce mémoire. L'étude a donc été orientée pour faire un portrait de la distribution des PO dans les éviers et de mettre en lien leur distribution avec la variation de la composition des communautés microbiennes et des propriétés physicochimiques de l'eau. La structure des données aurait pu permettre d'explorer l'impact potentiel des traitements, intégrés tardivement dans la séquence d'échantillonnage, sur des observations ponctuelles extrêmes (e.g. chute de la diversité microbienne suite au déploiement d'un drain Kleanik), mais aucune évidence en ce sens n'a été observée en raison de l'interruption spontanée et imprévue de l'échantillonnage.

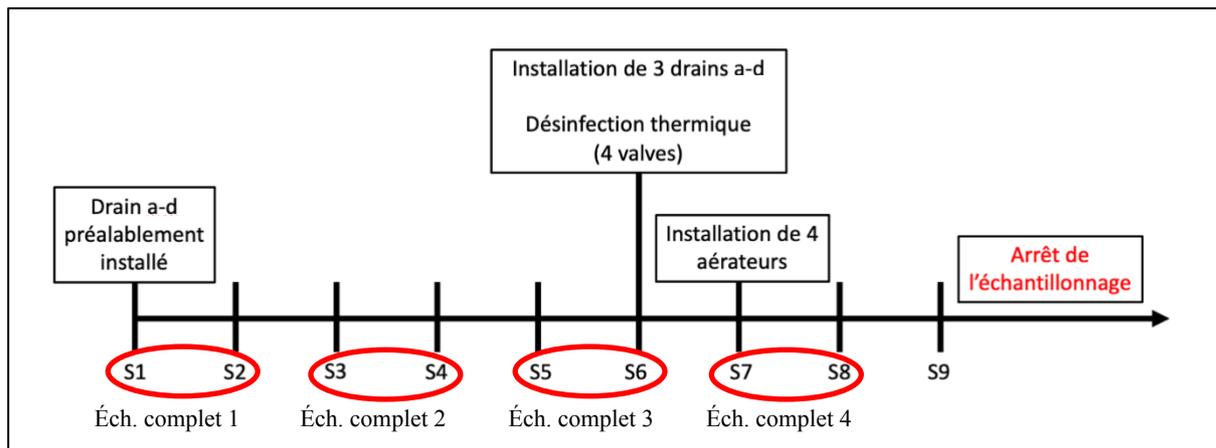


Figure 3-2 Échéancier de l'installation des divers traitements dans l'USIN de l'hôpital ayant fait l'objet de cette étude

Drain a-d : Drain auto-désinfectant

Éch. complet = Échantillonnage complet (20 éviers échantillonnés)

La procédure utilisée pour l'échantillonnage était la suivante (Figure 3-3). Le matériel nécessaire était préparé, stérilisé et identifié en amont des travaux d'échantillonnage. Celui-ci débutait par le prélèvement d'environ 150 mL d'eau du drain à l'aide d'une seringue de 50 mL et d'un tuyau (Norprene®, diamètre intérieur de 3,1 mm) de 30 cm pour les drains peu profonds et 70 cm pour les drains profonds. Par la suite, le biofilm du drain était écouvillonné et déposé dans un tube de 15 mL contenant 2 mL de solution saline stérile. L'eau du robinet était ensuite échantillonnée en débutant par le prélèvement de 2 L d'eau dans deux bouteilles d'1 L stériles contenant 1 mL d'une solution de thiosulfate de sodium à 1 % (neutralisant du chlore résiduel) pour les analyses microbiologiques. Environ 500 mL d'eau étaient ensuite prélevés pour les analyses physico-chimiques puis 50 mL pour la lecture de la turbidité. L'échantillonnage se finalisait par la mesure du débit de l'eau du robinet et l'écouvillonnage de la surface extérieure de l'aérateur ; l'écouvillon était ensuite déposé dans un tube de 15 mL contenant 1 mL d'une solution saline stérile.

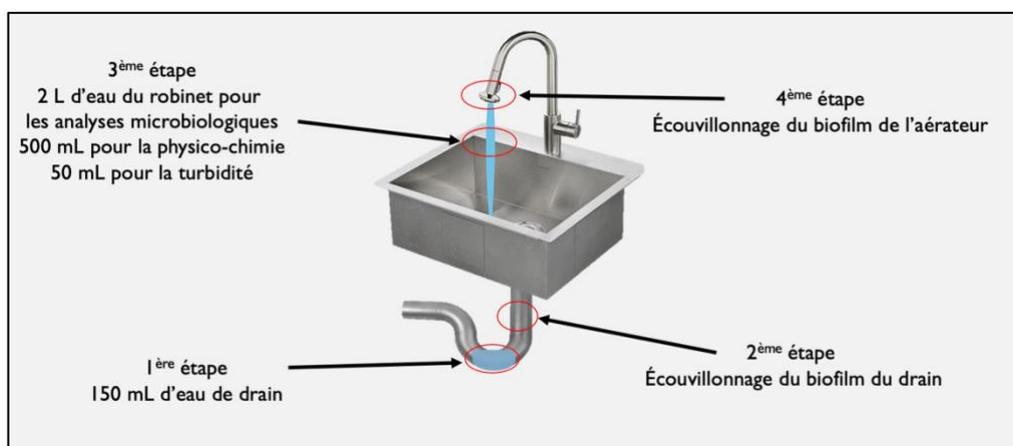


Figure 3-3 Étapes d'échantillonnage de l'environnement évier

3.1.2 Analyses physico-chimiques

Sur le terrain la mesure du chlore libre et total, de la conductivité, de l'oxygène dissous, de la température et du pH était directement effectuée. Le chlore libre et total étaient mesurés par colorimètre de poche (Hach pocket colorimeter) ; le pH, la température et l'oxygène dissout à l'aide de sondes (Hach, pH301 et LDO101) reliés à un multimètre (Hach, HQ 40d) et la conductivité par un conductimètre (Oakton cond 6+). La turbidité était quant à elle mesurée au laboratoire à l'aide d'un turbidimètre Hach, TL 2300 (méthode standard #2130 (American Public Health Association et al. 1912, Rice et al. 2012)).

3.2 Analyses de laboratoire

3.2.1 Traitement des échantillons

À la fin de l'échantillonnage, quatre échantillons étaient collectés par évier : l'eau du robinet (WF), l'eau du drain (WD), le biofilm du drain (BD) et le biofilm de l'aérateur (BF) ; l'objectif étant la détection et l'identification de trois PO (*P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *S. maltophilia*) et la caractérisation de la structure des communautés microbiennes de ces échantillons. L'identification pouvait se faire par culture sur milieux sélectifs (section 3.2.2) et par méthodes moléculaires (section 3.3.2). Tous les échantillons n'ont pas subi la même méthode de détection selon leur charge microbienne. Effectivement, des études préliminaires réalisées par mes co-équipiers ont révélé que la biomasse bactérienne dans les échantillons BF était trop faible pour permettre un suivi des PO par PCR. Une approche par culture sur milieux sélectifs a donc été privilégiée pour les échantillons BF. Au contraire, les échantillons de drains (BD et WD) présentaient une forte concentration bactérienne et étaient donc seulement analysés par PCR en passant par une extraction d'ADN. Les échantillons d'eau du robinet (BF et WF) étaient quant à eux à la fois mis en culture et analysés par méthode moléculaire. Le traitement des échantillons comportait des filtrations suivies de conditionnement en vue des mises en cultures, de leur cryogénéisation et extraction d'ADN subséquentes (Figure 3-4).

Procédure des robinets. Pour les échantillons WF, 250 mL d'eau étaient filtrés stérilement sur une membrane de 0,45 µm (mixed cellulose ester) puis déposée sur géloses nutritives sélectives. L'opération était répétée pour les trois PO. Pour le volet moléculaire, 1 L était filtré sur une membrane de 0,22 µm (mixed cellulose ester) et déposé dans un tube d'extraction d'ADN (Lysing Matrix A, MP BIO). Finalement, 100 µL des échantillons BF étaient étalés stérilement sur les trois milieux sélectifs à l'aide de trois billes en verre.

Procédure des drains. Pour les échantillons WD, 50 mL d'eau étaient filtrés sur une membrane de 0,22 µm (mixed cellulose ester) et déposés dans un tube d'extraction (Lysing Matrix A, MP BIO).

Finalemnt, 1 mL des échantillons BD était collecté dans un tube d'extraction contenant 250 mg de billes Zircona/Silica à 0,1 mm et 250 mg de billes en verre (Glass Beads Sigma-aldrich®) à 0,5 mm.

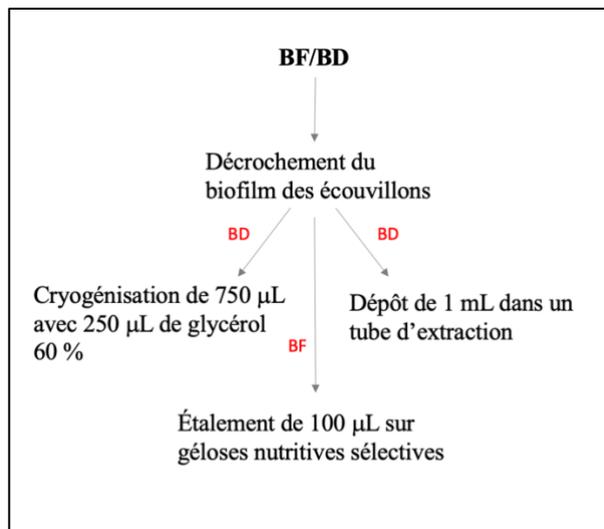
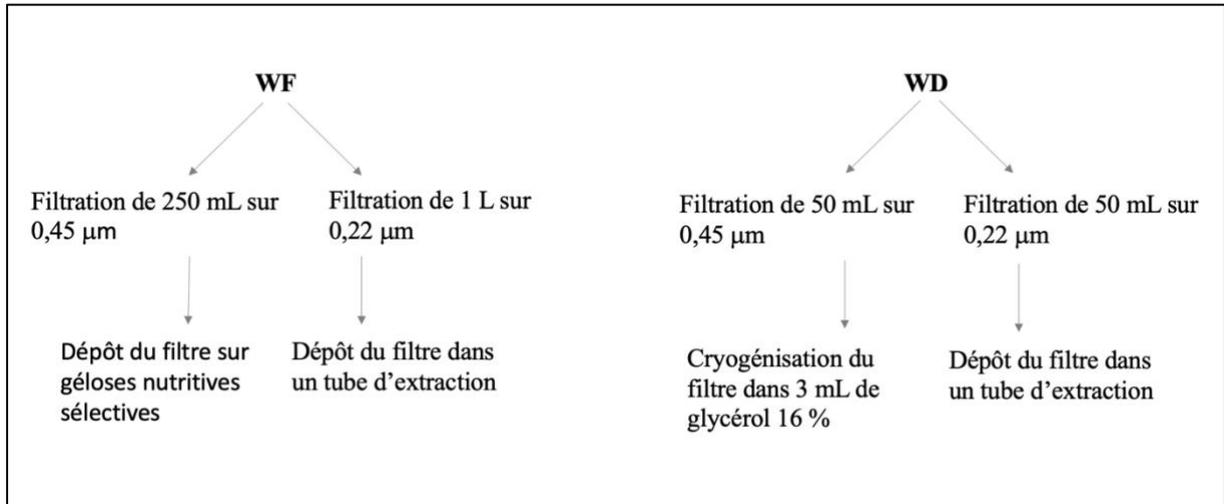


Figure 3-4 Schéma récapitulatif de la procédure du traitement des échantillons

3.2.2 Isolement des pathogènes opportunistes

Des milieux de culture spécifiques à l'enrichissement de chaque PO ont été sélectionnés par un de mes collègues (Thibault Bourdin) après les avoir évalués avec plusieurs souches de PO incluant des témoins négatifs (Tableau 3-2).

Tableau 3-2 Milieux de culture utilisés pour l'isolement des PO

Pathogènes recherchés	Milieu utilisé	Caractéristiques d'incubation	Phénotype attendu
<i>P. aeruginosa</i>	Cétrimide (Brown et al. 1965)	48 heures - 42 °C	Pigmentation jaune/verte
<i>S. marcescens</i>	Caprylate-thallos (Starr et al. 1976)	72 heures - 30 °C	Petites colonies sans phénotype spécifique
<i>S. maltophilia</i>	SM2I (Adjidé et al. 2009)	48 heures - 30 °C	Colonies vertes avec un halo bleu

Si une croissance était observée après la période d'incubation des trois milieux sélectifs, une colonie de chaque morphotypes différents observés par gélose était repiquée et isolée sur milieux de culture non sélectifs TSA et incubé 48 heures à 30 °C. Une colonie de chaque gélose était ensuite remise en culture dans 3 mL de milieu liquide TSB et incubé à 30 °C jusqu'à l'extraction de l'ADN génomique. Le jour de l'extraction, 1 mL de culture était prélevé et déposé dans un tube d'extraction contenant 250 mg de billes Zircona/Silica à 0,1 mm et 250 mg de billes en verre (Glass Beads Sigma-aldrich®) à 0,5 mm.

3.3 Analyses moléculaires

3.3.1 Extractions d'ADN

La méthode d'extraction d'ADN a été adaptée à partir du protocole de Yu et Mohn (Yu et al. 1999) consistant en une lyse bactérienne mécanique et chimique suivi d'une précipitation à l'acétate d'ammonium. Dans un premier temps, 1 mL de solution de Glycosides Hydrolases (GH) composée à 0,25 % d' α -amylase et 0,25 % de cellulase a été ajoutée aux échantillons BD pour une durée de 30 minutes afin de déloger les bactéries maintenues dans une matrice d'exopolymères. Les souches pures isolées étaient centrifugées pendant 10 minutes à 13 000 x g, le surnageant était ensuite jeté puis 1 mL de GH était ajouté pour 30 minutes. Ensuite, les échantillons BD, les souches pures ainsi que les échantillons de couches étaient centrifugés pendant 10 minutes à 13 000 x g, les surnageants éliminés puis les culots solubilisés dans 1 mL de tampon d'extraction (Tris HCl 50 mM, EDTA-2Na 5 mM, SDS 3%, pH 8,0) et 2 μ L de RNase (20 μ g/mL). Les filtres d'échantillons d'eau du drain et du robinet ont quant à eux été sectionnés stérilement en croix à l'aide d'une pince et de ciseaux afin de favoriser l'extraction puis 1 mL de tampon d'extraction et 2 μ L de RNase (20 μ g/mL) ont été ajoutés.

Suite à leur conditionnement, l'ensemble des échantillons ont subi le même traitement. Dans un premier temps, un FastPrep BeadBeating System (FastPrep-24 Classic, MP BIO) a été utilisé afin de lyser les cellules. Les échantillons ont subi deux cycles dont les paramètres étaient les suivants : 45 secondes de broyage à $6,5 \text{ m s}^{-1}$; 5 minutes sur glace ; 45 secondes de broyage. Après chaque cycle, les échantillons étaient centrifugés 5 minutes à $13\,000 \times g$ puis les surnageants étaient déposés dans des microtubes de 1 mL stériles. Afin de réaliser le deuxième cycle, 1 mL de tampon d'extraction et $2 \mu\text{L}$ de RNase ($20 \mu\text{g/mL}$) étaient de nouveau ajoutés aux tubes d'extraction ; cette étape n'était pas effectuée après le dernier cycle.

De l'acétate d'ammonium (2 M) était ensuite ajouté aux échantillons afin de réaliser la phase de précipitation des protéines. Le volume d'acétate d'ammonium utilisé était quatre fois plus petit que le volume des échantillons récupérés lors de la lyse. Après cela, les échantillons étaient placés sur glace pendant 5 minutes puis centrifugés pendant 15 minutes à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ à $14\,000 \times g$. Les surnageants ont été collectés dans des microtubes stériles de 1 mL et ces derniers subissaient le même cycle ; 5 minutes sur glace et centrifugation 15 minutes à $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $14\,000 \times g$ puis collecte du surnageant dans de nouveaux tubes stériles. Un volume d'isopropanol égal aux volumes des surnageants récupérés a été ajouté avec $5 \mu\text{L}$ de glycogène (2 %) permettant de fixer l'ADN. Les tubes ont finalement été placés à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant au moins 16 heures. L'ADN génomique précipité a ensuite été purifié par deux lavages à l'éthanol (70 %). Après le dernier lavage, les tubes ont été laissés ouverts pendant 10 minutes sous enceintes de sécurité biologiques afin de permettre aux dernières traces d'éthanol de s'évaporer. Finalement, les culots ont été solubilisés dans $50 \mu\text{L}$ d'eau Milli-Q stérile puis les concentrations d'ADN étaient quantifiées au spectrophotomètre. Les échantillons étaient entreposés à $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'aux prochaines analyses.

3.3.2 Génotypage des pathogènes opportunistes par HiSST

L'ensemble de cette partie a été effectuée par un étudiant en doctorat de l'INRS-AFSB qui a développé une méthode d'identification moléculaire HiSST (typage de séquences courtes à haut débit) pour la détection des trois PO recherchés dans cette étude (Bourdin et al. 2021). Dans un premier temps, une base de données pan-génomique a été créée à partir des génomes complets de plusieurs souches de chaque PO trouvés sur la base de données NCBI GenBank puis, par le biais d'une série d'analyses bio-informatiques les loci les plus spécifiques et discriminants ont été sélectionnés (séquences allant de 250 à 300 pb). Un total de trois loci ont alors été choisis pour *S. marcescens* ainsi que quatre pour *S. maltophilia* et *P. aeruginosa* (Tableau 3-3).

Tableau 3-3 Loci spécifiques ciblés pour chaque PO selon la méthode HiSST

Pathogènes recherchés	Loci spécifiques
<i>P. aeruginosa</i>	<i>btuB, bvgS, pheT, sdaB</i>
<i>S. marcescens</i>	<i>bssA, gabR, dhaM</i>
<i>S. maltophilia</i>	<i>yvoA, glnG, ribA, tycC</i>

Par la suite, des amorces spécifiques à chaque locus et allant de 18 à 22 nucléotides ont été conçues et ces dernières ont été validées grâce à plusieurs souches de références incluant des témoins négatifs. La méthode validée a été appliquée pour la détection des trois PO dans tous les échantillons d'ADN extraits des éviers et des souches isolées sur milieux sélectifs. Chaque échantillon était d'abord soumis à une PCR ne ciblant qu'un seul locus par PO ; *pheT* pour *P. aeruginosa*, *bssA* pour *S. marcescens* et *glnG* pour *S. maltophilia*. Dans le cas où une amplification était observée, les échantillons subissaient alors les PCR complémentaires ciblant les autres loci. Finalement un séquençage Illumina Miseq PE 250 était réalisé afin de confirmer la spécificité des amplicons PCR issus de l'ADN environnemental et d'identifier les souches isolées. Les allèles de chaque locus étaient identifiés à l'aide de numéro (séquence type) et assignés à une base de données centrale, ainsi une séquence de numéros obtenue à l'issue du séquençage Illumina était spécifique à chaque souche. Cette méthode comportait un très bon pouvoir discriminant entre les souches, permettant de faire le suivi de la transmission des souches entre les différents environnements échantillonnés. Puisque l'échantillonnage à l'hôpital a été réalisé sur une période de temps relativement courte (trois mois, avec trois échantillons par évier), il fut convenu de représenter la distribution des trois PO de chaque environnement échantillonné (numéro de chambre et environnement) en une variable nominale (présence ou absence). L'absence était attribuée lorsqu'aucun des échantillons représentatifs de chaque chambre et environnement avait permis la détection du PO d'intérêt. La notion de présence était quant à elle considérée lorsqu'au moins un des PO était retrouvé dans un échantillon à au moins une date.

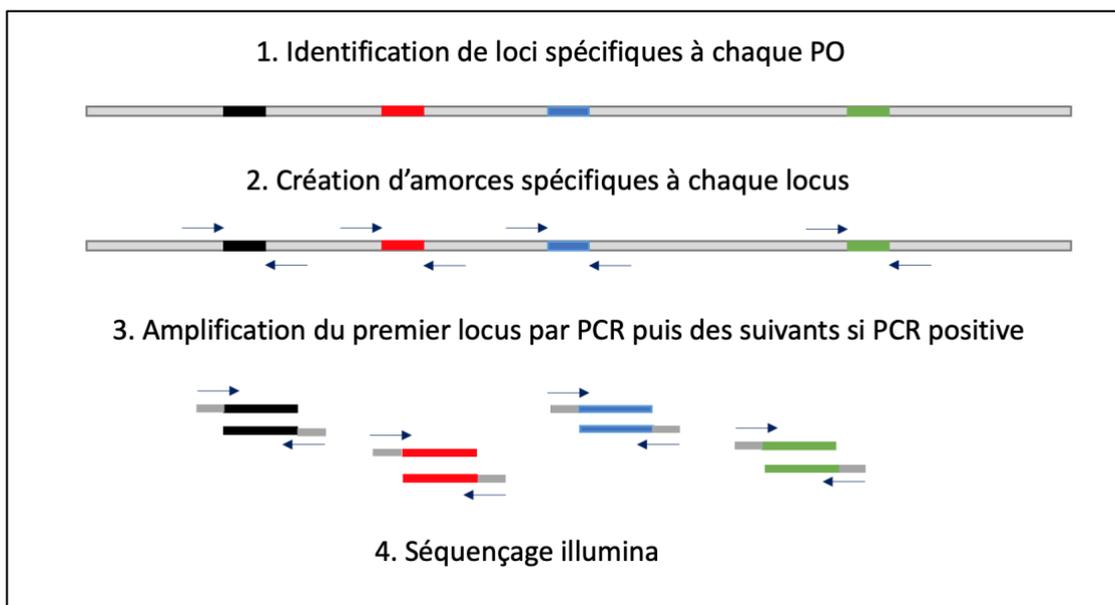


Figure 3-5 Schéma récapitulatif du génotypage des PO

3.3.3 PCR du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries et création des bibliothèques de séquençage

Les échantillons d'ADN génomique ont été soumis à des PCR afin d'amplifier un fragment du gène de l'ARNr 16S des bactéries. Les régions V3 et V4 de ce gène ont été amplifiées à l'aide d'amorces universelles spécifiques référencées sur Omega Bioservice (OmegaBioservices).

- Illumina F : CCTACGGGGNGGCWGCAG
- Illumina R : GACTACHVGGGTATCTAATCC

Pour commencer un mélange de réactifs contenant de l'eau Milli-Q filtrée stérile, les amorces F et R (10 μ M), du $MgSO_4$ (25 mM), du BSA (Albumine de sérum bovin) (20 μ g/mL), du tampon II (10 X) comprenant des concentrations finales respectives de 0,21 μ M, 0,27 mM, 0,22 μ g/mL et 1,09 X était réalisé sous une enceinte biologique dédiée à la préparation des réactifs de PCR. De la Taq polymérase Haute-Fidélité a été ajoutée (x 0,5 U) pour limiter les erreurs lors de la réplification de l'ADN. Les volumes de chaque constituant à ajouter pour préparer le mélange des réactifs sont indiqués en annexe I. Un total de 240 échantillons d'ADN (comprenant les échantillons BD, WD et WF) ont été soumis à la PCR qui a été effectuée avec la programmation du thermocycleur décrite en annexe II. Les amplicons PCR ont été visualisés suite à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 %. Les 208 échantillons ayant démontré une amplification positive ont été entreposés à -20 °C jusqu'à la préparation des bibliothèques de séquençage. Cette étape consistait en plusieurs lavages des amplicons, deux PCR et une quantification du composite d'amplicons de PCR à séquencer (Figure 3-6).

Pour commencer la préparation des bibliothèques de séquençage, une première PCR a été effectuée avec les amorces Illumina F et Illumina R comportant un adaptateur en 5' compatible au second jeu

d'oligonucléotides utilisés pour intégrer les codes à barre nucléotidiques spécifiques à chaque échantillon d'ADN. Un lavage des amplicons a été effectué afin d'éliminer les dimères d'amorces et les amorces résiduelles issues de la première PCR. Pour ce faire, 16 μL de billes (AMPure XP beads) ont été mélangées à 20 μL d'amplicons afin de fixer ces derniers puis le tout a été incubé à température pièce pour 5 minutes. Ensuite, la plaque a été incubée pendant 2 minutes à température pièce sur un support magnétique dans le but de fixer les billes magnétiques et les amplicons aux parois de la plaque. Le surnageant a été éliminé, puis toujours sur la plaque magnétique, deux lavages successifs à l'éthanol ont été effectués constitués des cycles suivants : ajout de 200 μL d'éthanol 80 % fraîchement préparé ; incubation pendant 30 secondes à température pièce et élimination du surnageant. Les puits ont ensuite été laissés à sécher pendant 10 minutes puis la plaque a été enlevée du support magnétique afin de remettre les billes et les amplicons en suspension dans 52,5 μL de Tris-HCl (10 mM, pH = 8,5). Cette étape a permis de décrocher les amplicons des billes et ainsi de les mélanger au tampon. La plaque a de nouveau été incubée pour 2 minutes sur le support magnétique dans le but de refixer les billes (sans amplicons cette fois-ci) sur les parois.

Finalement, 50 μL du surnageant composé de Tris et des amplicons ont été transférés sur une autre plaque 96 puits. Une PCR index a ensuite été effectuée afin d'ajouter les adaptateurs Illumina et un code à barre nucléotidique unique à chaque échantillon pour leur identification et distinction après le séquençage. Le mélange de réactifs PCR décrit à l'annexe III a été préparé avant de déposer 16 μL dans chaque puits d'une plaque 96 puits. Un volume de 2 μL de différentes combinaisons d'amorces (5 μM) a été ajouté selon le schéma présent en annexe IV. Des combinaisons d'amorces différentes ont été utilisées pour chaque plaque. Par la suite, 5 μL des amplicons purifiés ont été ajoutés puis la réaction de PCR a été effectuée selon les cycles indiqués en annexe V. Un nouveau lavage a ensuite été réalisé de façon identique au premier, seuls les volumes des solutions de billes et de Tris différaient. Pour ce lavage, 28 μL de billes (AMPure XP beads) étaient nécessaire ainsi que 27,5 μL de Tris (10 mM, pH = 8,5) par échantillon. Finalement, lors de la dernière étape 25 μL du surnageant contenant le tampon Tris et les amplicons étaient transférés dans une nouvelle plaque 96 puits.

Après le dernier lavage, une quantification des amplicons a été effectuée à l'aide d'une trousse commerciale Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay (Invitrogen-P7589) sur une plaque 96 puits noire (Corning-Costar-3792) pour évaluer les volumes à prélever de chaque échantillon afin de constituer le composite d'amplicons PCR qui serait envoyé au centre d'expertise et de services Génome Québec pour le séquençage. La concentration de chaque amplicon PCR à intégrer dans un mélange d'amplicons à séquencer était de 1,5 ng/ μL . Ensuite, dans un microtube de 1,5 mL, les échantillons ont été combinés selon leur volume respectif puis 75 μL de ce mélange a été déposé dans le premier puit d'une plaque 96 puits (Microtube twin.tec jupe complète (no. 951020401)). Finalement, la plaque a été envoyée dans glacière remplie de glace sèche à Génome Québec qui a pris en charge le séquençage du composite de librairies.

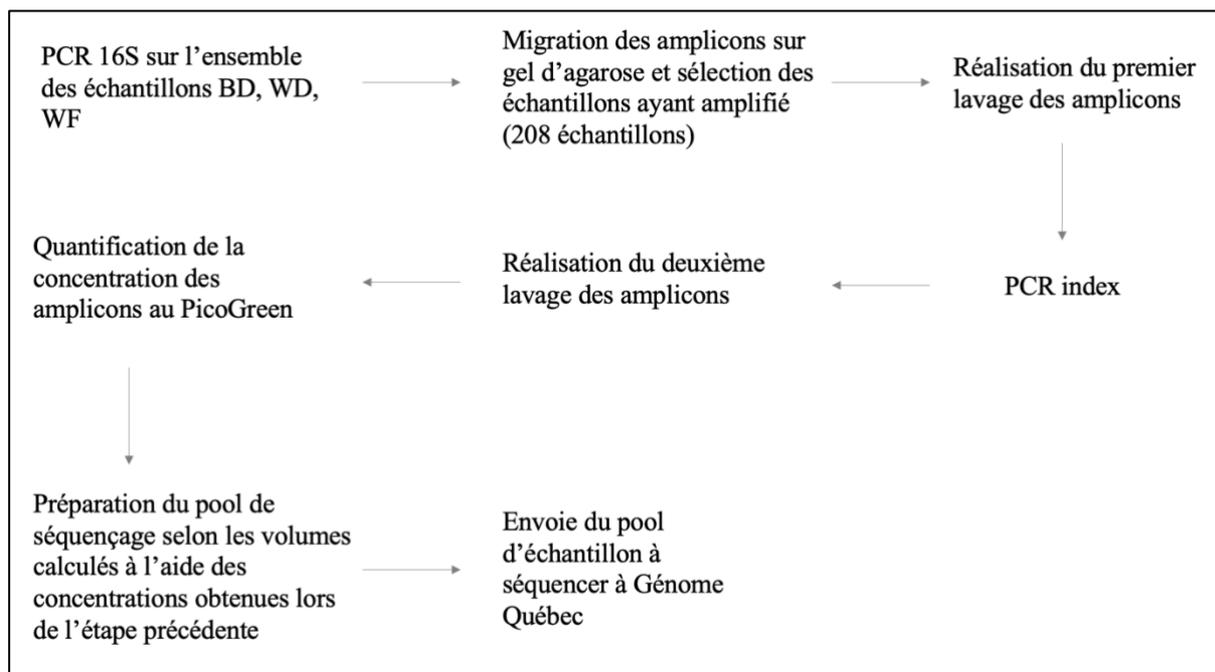


Figure 3-6 Schéma récapitulatif de la création des bibliothèques de séquençage

3.4 Traitement des résultats de séquençage

Après le séquençage, les séquences d'ADN en format FASTQ correspondant à chaque échantillon ont été récupérées sur la plateforme Nanuq puis soumises à une série de traitements bio-informatiques exécutées en utilisant le logiciel R sur le serveur Graham de Calcul Canada. Dans un premier temps, les séquences d'amorces ont été supprimées à l'aide de l'outil cutadapt (Martin 2011), un module d'extension de Python. Par la suite, les séquences dépourvues d'amorces ont subi une succession de traitements à l'aide du module dada2 (Callahan et al. 2016) permettant une analyse précise des séquences à la base près. Pour commencer, les séquences ont été soumises à un contrôle qualité selon des critères de qualité des bases et de longueur des séquences. Les séquences ont ensuite été dérépliquées en tenant compte du taux d'erreurs introduit par le séquençage pour alléger les tâches suivantes. Les séquences pairées ont alors été assemblées pour reconstituer le fragment de PCR amplifié puis ces séquences ainsi assemblées ont été inspectées pour éliminer les chimères en utilisant l'approche « *de novo* ». Finalement, les séquences non chimériques ont été comparées à une base de données de référence "silva_nr99_v138_train_set.fa", permettant ainsi de leur attribuer une affiliation taxonomique. Quatre fichiers ont été générés à la fin de ces suites de commandes : summary.csv, 16S ASV counts.csv, 16S ASV taxonomy.csv et 16S asv.få. Ces derniers correspondaient respectivement à un sommaire des performances du contrôle de qualité pour chaque échantillon, au nombre de séquences correspondant aux différents ASV dans chaque échantillon, à l'affiliation taxonomique des différents ASV et enfin la séquence de chaque ASV en format fasta. Les fichiers récupérés ont été compilés et soumis à une seconde phase de contrôle de qualité. Pour commencer, les échantillons possédant un nombre de séquences non chimériques trop faibles par rapport à la moyenne ont été éliminés pour la suite des

analyses. Ces derniers correspondaient à l'échantillon WF-PLM prélevé le 21 janvier 2020 et aux échantillons BD-55 et WF-63 prélevés le 25 février 2020. Par la suite, un seuil critique a été appliqué aux ASV afin de conserver seulement ceux dont le nombre de séquences détectées dans l'ensemble des échantillons était supérieur à 0,005 % de la somme totale des séquences pour tous les ASV. Ce seuil a été établi pour limiter le risque de faire des analyses statistiques subséquentes sur des matrices dont la diversité est artificiellement augmentée par les amplifications PCR successives.

Puisque l'échantillonnage à l'hôpital a été réalisé sur une période de temps relativement courte (trois mois, avec trois échantillons par évier), il fut convenu de représenter chaque environnement échantillonné (numéro de chambre et environnement) par un profil d'abondance d'ASV moyen. En effet, la période d'échantillonnage était trop courte pour observer et conclure sur une quelconque évolution de la niche écologique de l'environnement évier en fonction du temps. Les variations observées seraient causées par la combinaison d'un biais d'échantillonnage (imperfection de la représentativité des échantillons) ainsi que des successions microbiennes réelles.

3.5 Analyses statistiques

Une première série d'analyses s'est intéressée à étudier la relation des paramètres physico-chimiques entre eux et de déterminer quels facteurs physico-chimiques contribuaient le plus à distinguer les différents échantillons. Ainsi, une analyse en composantes principales (ACP) qui est une technique d'analyse multivariée sans contrainte permettant de représenter et de créer des liens entre plusieurs données d'un tableau contenant des variables généralement corrélées entre elles a été effectuée (Abdi et al. 2010).

Une deuxième série d'analyses s'est intéressée à explorer la variation de la diversité alpha des communautés microbiennes dans les éviers. Pour ce faire, trois mesures de diversité ont été calculées ; la richesse spécifique, la diversité de Shannon et la diversité de Simpson. Ces différents indices ont été calculés sur Rstudio version 1.4.1103 à l'aide du module iNext (Hsieh et al. 2016) en utilisant l'approche d'extrapolation basée sur un modèle dont les paramètres reposent sur le nombre d'ASV observé en fonction du nombre de séquences obtenues dans chaque librairie de séquençage. Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn ont été effectués à l'aide du module dunn.test (Dinno 2015) afin de définir s'il y avait une différence significative entre la distribution des différents indices de diversité en fonction du type d'échantillon (WF, WD, BD). Ce test autorisant les comparaisons entre de multiples échantillons indépendants de même taille ou non correspondait parfaitement aux types d'analyses nécessaires pour traiter nos données ne comprenant pas le même nombre d'observations d'un échantillon à l'autre. Ces analyses ont été effectuées en appliquant la méthode de correction de comparaisons multiples de Bonferroni.

Une troisième série d'analyses s'est intéressée à explorer la variation de la diversité bêta des communautés microbiennes dans les éviers. Les données d'abondances des ASV ont d'abord été transformées par la méthode d'Hellinger (Legendre et al. 2001) qui permet de réduire la contribution des abondances nulles dans les calculs subséquents. Une analyse en coordonnées principales (ACoP) a été effectuée sur la base de la dissimilarité de Bray-Curtis, permettant d'identifier les différences et les similitudes présentes au niveau de l'abondance relative des ASV entre les échantillons. L'indice de dissimilarité de Bray-Curtis est compris entre 0 et 1, ainsi plus les échantillons ayant un indice proche de 0 auront une composition similaire et au contraire, plus l'indice de ces derniers se rapprochera de 1, plus leur composition sera différente. La PCoA permettait d'explorer les échantillons dont les profils de communautés microbiennes étaient les plus similaires ou différents pour ensuite tenter de déduire quels facteurs environnementaux pouvaient expliquer leur degré de similarité. Cette interprétation était complétée par une PERMANOVA (Analyse Multivariée Permutationnelle de la Variance) ayant pour objectif d'identifier quels facteurs (chambre ou type d'échantillon) expliquaient les variations de diversité entre les échantillons (Anderson 2014). Par la suite, la méthode nommée ANCOM-II (Kaul et al. 2017) a été employée pour rechercher si des genres bactériens étaient spécifiques à un environnement donné (chambre ou type d'échantillon). Ce test statistique a été conçu en fonction des particularités de la matrice d'abondance des ASV : une matrice compositionnelle dominée par des valeurs nulles qui sont soit aberrantes, structurelles (ASV ne devant pas être présents dans l'échantillon pour diverses raisons) et ou des valeurs nulles d'échantillonnage (causées par un manque de profondeur de l'échantillonnage). Dans un premier temps, l'hypothèse selon laquelle certains taxa étaient spécifiques à une chambre a été testée, puis dans un second temps spécifique à un type d'échantillon. Pour clôturer l'analyse de la diversité bêta, un test de db-RDA (analyse de redondance basée sur la distance Bray-Curtis) a été effectué afin d'étudier la dynamique des communautés bactériennes dans les échantillons d'eau du robinet selon les paramètres physico-chimiques (Legendre et al. 1999). Pour ce faire, la table d'ASV des échantillons WF a été soumise à la transformation Hellinger tel qu'expliqué précédemment, puis, cette dernière a été mise en lien avec une matrice constituée des valeurs des paramètres physico-chimiques. Un graphique constitué de deux axes (CAP 1 et CAP 2) a ainsi été obtenu permettant d'expliquer le profil de distribution des communautés bactériennes selon les paramètres physico-chimiques. Le test de db-RDA était accompagné d'une ANOVA afin de s'assurer de l'impact significatif des deux axes du graphique sur la relation des variables étudiées.

Le lien potentiel entre la structure des communautés microbiennes de l'environnement évier et de la présence/absence de pathogènes a été exploré. Dans un premier temps, une matrice de corrélation permettant de visualiser la nature de la relation entre les indices de diversité alpha et les pathogènes a été effectuée en utilisant le module corrplot (Wei et al. 2017). Ensuite, un test de corrélation selon la méthode de Spearman a été effectué afin de définir la significativité des relations préalablement observées avec la matrice de corrélation. La méthode de Spearman a été choisie pour son avantage à

étudier la relation entre deux variables monotones ne suivant pas une distribution normale. Par la suite, le lien entre la structure des communautés microbiennes de l'environnement évier (diversité bêta) et la présence ou non de pathogènes dans ces mêmes éviers a été étudié. Pour ce faire, un test de db-RDA a de nouveau été effectué tel qu'expliqué dans l'étude de la diversité bêta. En premier lieu, la table contenant la proportion des ASV associés aux échantillons a de nouveau été soumise à la transformation Hellinger. Cette matrice a ensuite été mise en lien avec une seconde matrice constituée de l'occurrence des trois pathogènes dans les échantillons (présence ou absence). Le but de cet exercice était d'établir s'il existe une relation entre la présence de pathogènes et la structure des communautés microbiennes de l'environnement. Une ANOVA complémentaire a alors été effectuée sur le test de la db-RDA afin de déterminer si les deux axes présents sur le graphique expliquaient la relation entre les variables de manière significative. Finalement, un fichier de sortie de la db-RDA a permis de procéder à l'identification taxonomiques des principaux ASV se démarquant des autres (non centroïdes) et des tests de corrélation de Spearman ont été effectués afin de s'assurer de la significativité des corrélations entre les ASV identifiés et la présence ou absence des pathogènes.

Une autre série d'analyse s'est intéressée à étudier la relation entre les paramètres physico-chimiques et le profil de distribution des pathogènes dans les échantillons de drains. Dans un premier temps, un test de Dunn a été effectué afin de s'assurer que le profil de distribution des pathogènes ne différaient pas significativement entre les échantillons de biofilms de drain et d'eau de drain. Ainsi, une moyenne de l'occurrence des pathogènes dans ces environnements a pu être réalisée pour la suite des analyses. Une matrice de corrélation a alors de nouveau été effectuée, cette dernière était accompagnée des informations de significativité concernant chacune des relations étudiées.

Pour clôturer l'ensemble de ces analyses, une analyse de partitionnement de la variation définissant les proportions d'explications de la variation de la diversité bactérienne par les paramètres physico-chimiques et le profil de distribution des pathogènes dans les échantillons de drains a été réalisée à l'aide du package vegan (Dixon 2003). Trois matrices ont été mises en lien dans le cadre de cette analyse, la table d'ASV des drains (soumise à la transformation Hellinger), les paramètres physico-chimiques (variables centrées-réduites) et la matrice d'occurrence des pathogènes dans les échantillons de drains (présence/absence). L'intérêt de cette analyse est qu'elle permet d'identifier les variables qui contribuent la plus à expliquer la variation des communautés microbiennes des éviers tout en identifiant la redondance qui peut exister entre certaines des variables.

4 RÉSULTATS

Cette section a été consacrée à analyser l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce projet. En premier lieu, la dynamique de distribution des échantillons en fonction des paramètres physico-chimiques a été étudiée, suivi de l'analyse du profil d'occurrence des PO dans les différents environnements échantillonnés. Ensuite, la diversité des communautés bactériennes a été caractérisée en s'intéressant dans un premier temps à la diversité alpha puis dans un second temps à la diversité bêta. Finalement l'ensemble des résultats ont été mis en relation afin d'expliquer le profil de distribution des pathogènes dans les éviers en fonction de la niche écologique et de la physico-chimie.

4.1 Physico-chimie de l'eau

Une ACP a permis d'identifier deux facteurs représentés par deux axes (Dim1 et Dim2) permettant d'expliquer au mieux les différences des environnements selon les paramètres physico-chimiques (Figure 4-1). Les facteurs représentés par Dim 1 et Dim 2 possèdent respectivement une influence de 41,3 % et 17 % sur la distinction des échantillons, expliquant alors à eux deux 55,3 % des différences entre les environnements. En premier lieu, il est observé que le chlore résiduel est le facteur possédant le plus une trajectoire horizontale indiquant donc qu'il est le facteur principal permettant de distinguer les différents environnements. Ce dernier pourrait donc être assigné au facteur représenté par l'axe Dim1. L'orientation des échantillons le long de cet axe suit donc un gradient de concentrations, avec les plus fortes retrouvées dans les coordonnées négatives. Par la suite, il est constaté que le pH suit une trajectoire quasiment verticale l'assignant ainsi comme le deuxième facteur distinguant le plus les différents environnements et pouvant donc être identifié par Dim 2. Contrairement au chlore résiduel, la répartition des échantillons autour de sa trajectoire semble plutôt homogène. De plus, la trajectoire du chlore (total et résiduel) et de la conductivité semble opposée à celle de la température et de la turbidité, alors que celle du pH paraît plutôt contraire à celle de l'oxygène dissous. Finalement, aucun regroupement de chambres situées à proximité (Figure 3-1) n'a pu être observé sur cette ACP.

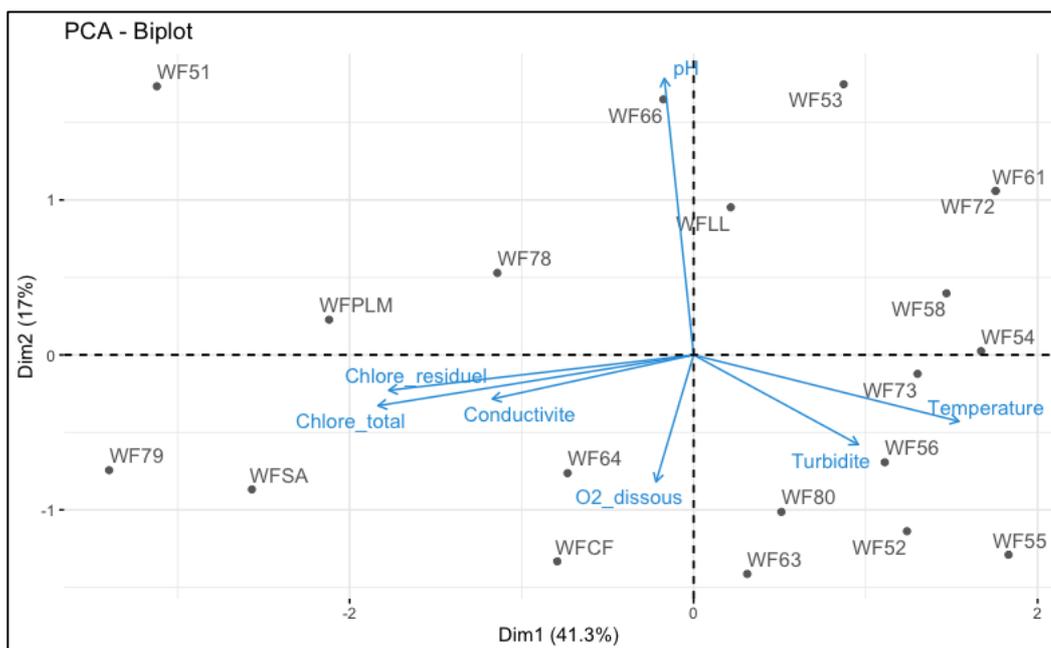


Figure 4-1 ACP permettant d'identifier les variables physico-chimiques distinguant au mieux les différents environnements

Chaque point correspond à l'eau d'un évier différent

4.2 Étude de l'occurrence des pathogènes d'intérêts dans l'environnement évier

À la suite de la détection des PO par les méthodes de culture et de PCR, il s'est avéré que *S. maltophilia* a été le pathogène le plus retrouvé à l'échelle des éviers, ne prenant pas en compte ici le facteur « type d'échantillon » (Tableau 4-1). En effet, sur la totalité de l'échantillonnage celui-ci a été retrouvé dans 64 % des éviers représentant près du double du taux de positivité de *P. aeruginosa* dans les éviers (33 %). Cette observation est d'autant plus mise en évidence pour le premier échantillonnage (regroupant les 20 éviers échantillonnés de cette étude) où 80 % des éviers ont été positifs à ce dernier. Le taux de positivité de *S. marcescens* a été celui le plus stable dans le temps avec une moyenne d'éviers positifs de 41 % (Tableau 4-1).

Par ailleurs, la proportion d'éviers positifs a progressivement diminué au cours du temps. En effet, plus de la moitié des éviers (53 %) étaient positifs aux PO lors du premier échantillonnage contre seulement 37 % lors du dernier échantillonnage. Les taux d'éviers positifs à *S. maltophilia* et *P. aeruginosa* ont notamment diminué graduellement au cours du temps même si une stagnation à 65 % pour les éviers positifs à *S. maltophilia* a été observée lors des deuxièmes et troisièmes échantillonnages. Par ailleurs, il est à noter que la diminution de l'occurrence de *S. maltophilia* et *P. aeruginosa* dans les éviers est remarquable (Tableau 4-1). En effet, le taux d'éviers positifs est passé de 80 % à 45 % pour *S. maltophilia* et de 40 % à 25 % pour *P. aeruginosa*.

Tableau 4-1 Proportions des évier positifs au pathogènes au cours du temps

Semaines	Éviers positifs			Total
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
S1 + S2	40 %	40 %	80 %	53 %
S3 + S4	35 %	45 %	65 %	48 %
S5 + S6	30 %	40 %	65 %	45 %
S7 + S8	25 %	40 %	45 %	37 %
Total	33 %	41 %	64 %	46 %

S1 + S2 : Échantillonnage complet n°1 S2 + S3 : Échantillonnage complet n°2 S5 + S6 : Échantillonnage complet n°3 S7 + S8 : Échantillonnage complet n°4

Tel qu'indiqué sur le tableau 4-2 et la figure 4-2, les échantillons de drains sont ceux présentant le plus haut taux de positivité par rapport aux échantillons du robinet avec un taux global de 55 % pour les échantillons de drains et de 10 % pour les échantillons du robinet. De plus, les PO retrouvés dans les échantillons de drain sont généralement les mêmes pour les échantillons BD et WD d'une même chambre (Figure 4-2).

Par ailleurs, tel qu'observé précédemment sur le tableau 4-1, *S. maltophilia* est le pathogène étant principalement présent dans les échantillons et ce, peu importe le type d'échantillon (Tableau 4-2). En effet, chaque chambre ayant été positive à un PO, à au moins une fois été positive à *S. maltophilia* excepté pour les chambres 51 et 78 (Figure 4-2).

Il est à noter que les chambre 63 et 64 présentent exactement le même profil d'occurrence des PO, les chambres étant situées à côté l'une de l'autre (Figure 1-1), il se pourrait que les drains soient communiquant ou encore qu'une même infirmière soit chargée de ces deux chambres et qu'en se lavant les mains elle favorise la transmission des PO d'une chambre à l'autre.

L'évier de la chambre 73 et le poste de lavage des mains (PLM) ont été les deux seuls éviers positifs aux trois PO et le PLM a été l'environnement dont l'occurrence des PO a été la plus importante (Figure 4-2). Une fois de plus, cette observation semble logique étant donné que le PLM est l'évier situé à l'entrée de l'USIN ce qui en fait l'évier principal pour se laver les mains à la fois pour le personnel hospitalier et pour les visiteurs.

Finalement, seule la chambre 79 n'a été positive à aucun pathogène et onze chambres (52, 54, 55, 63, 64, 80, SA, 61, 72, 73, PLM), représentant plus de la moitié des chambres échantillonnées, ont été positives à au moins un même PO sur la durée totale de l'échantillonnage révélant donc d'un profil d'occurrence des PO constant dans les éviers de cette USIN.

Tableau 4-2 Taux d'occurrence des PO selon le type d'échantillon

Type d'échantillon	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. maltophilia</i>	Total
BD	45 %	35 %	85 %	55 %
WD	50 %	40 %	75 %	55 %
WF	5 %	10 %	15%	10 %
BF	10 %	0 %	20 %	10 %

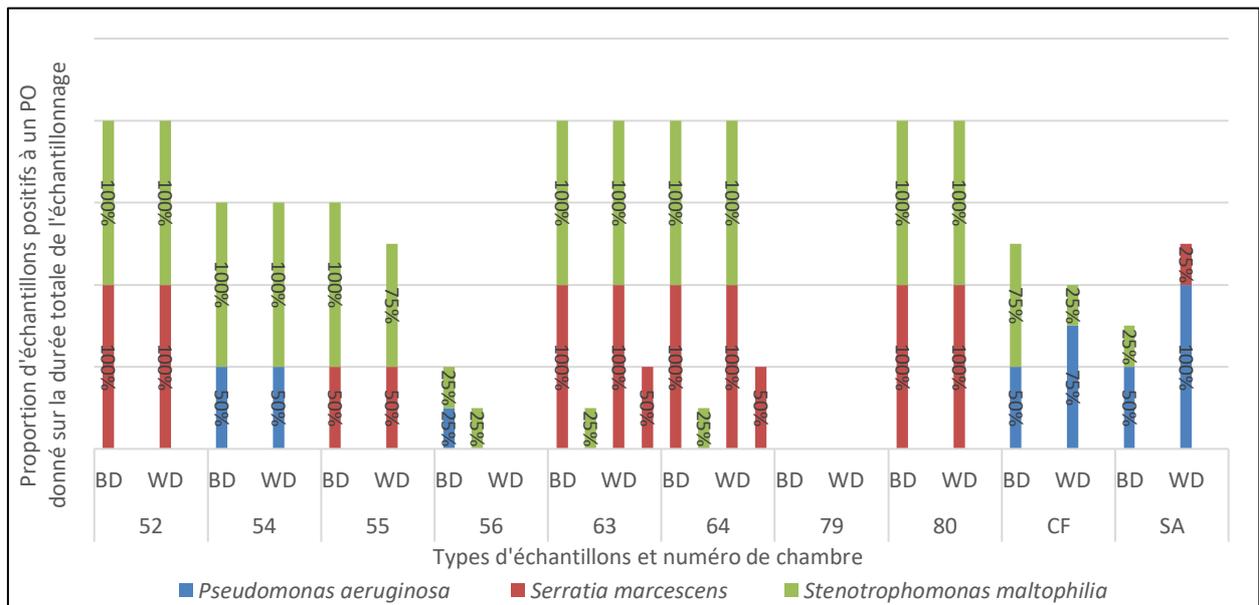
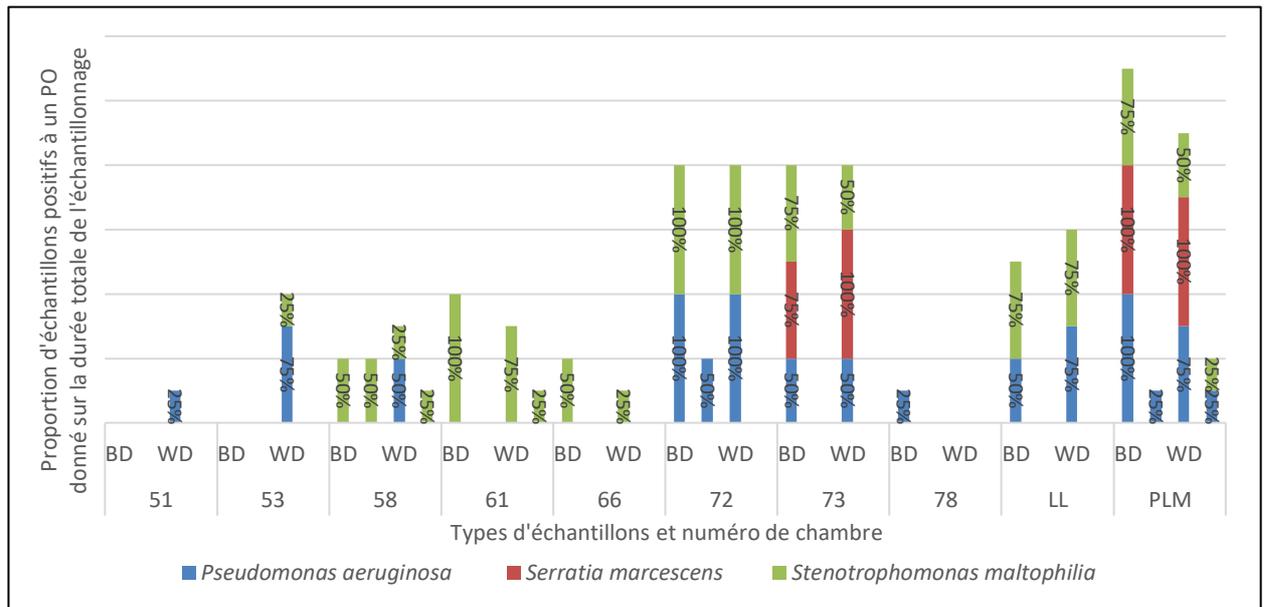


Figure 4-2 Proportion de positivité des pathogènes d'intérêt selon la chambre et le type d'échantillon

4.3 DIVERSITÉ ALPHA

La diversité alpha vise à documenter le nombre et l'équitabilité des ASV observés dans un échantillon. Trois indices ont été pris en compte pour cette étude ; l'indice de diversité spécifique, l'indice de diversité de Shannon et l'indice de diversité de Simpson dont le calcul accorde une grande importance respectivement, aux espèces rares, aux espèces abondantes et aux espèces dominantes présentes dans les échantillons.

4.3.1 Analyse de la répartition des données

Cette section a été la première étape de l'analyse de la diversité et a été réalisée dans le but de visualiser l'organisation et la répartition des données afin d'identifier certaines valeurs pouvant être extrêmes. Ainsi, cela a permis de définir la stratégie d'organisation des données la plus appropriée pour les analyses subséquentes.

Une répartition globalement homogène des données pour les trois niveaux d'indices de diversité étudiés a pu être mise en évidence (Figure 4-3). Cependant, certaines valeurs semblent à l'écart des autres pour l'indice de diversité spécifique ainsi que pour l'indice de diversité de Simpson. En effet, trois valeurs dont deux au niveau de l'eau du drain pour la chambre 56 et le laboratoire de préparation du lait et une correspondant à l'eau du robinet de la chambre 58 paraissent extrêmes dans le cas de la diversité spécifique. Quant à la diversité de Simpson, trois valeurs au niveau de l'eau du robinet de la chambre 61 ainsi qu'une valeur correspondant à l'eau du robinet de la chambre 63 et une valeur de l'échantillon d'eau de drain de la chambre 56 semblent à l'écart. Par ailleurs, l'ensemble des données de l'indice de diversité de Shannon semble plus épars, il est donc plus difficile d'identifier des valeurs extrêmes pour ce dernier. Puisqu'aucune explication biologique pouvait être formulée pour expliquer ces écarts, toutes les données ont été conservées pour la suite des analyses. De plus, en examinant la distribution des données, il fut convenu de travailler avec un indice de diversité moyen par chambre et par type d'échantillon. Cette approche permettait de limiter l'interférence potentielle du facteur « date » pouvant parfois porter des valeurs aberrantes en raison de la difficulté de représenter fidèlement la diversité microbienne en place dans chaque environnement lors de chacun des exercices d'échantillonnage.

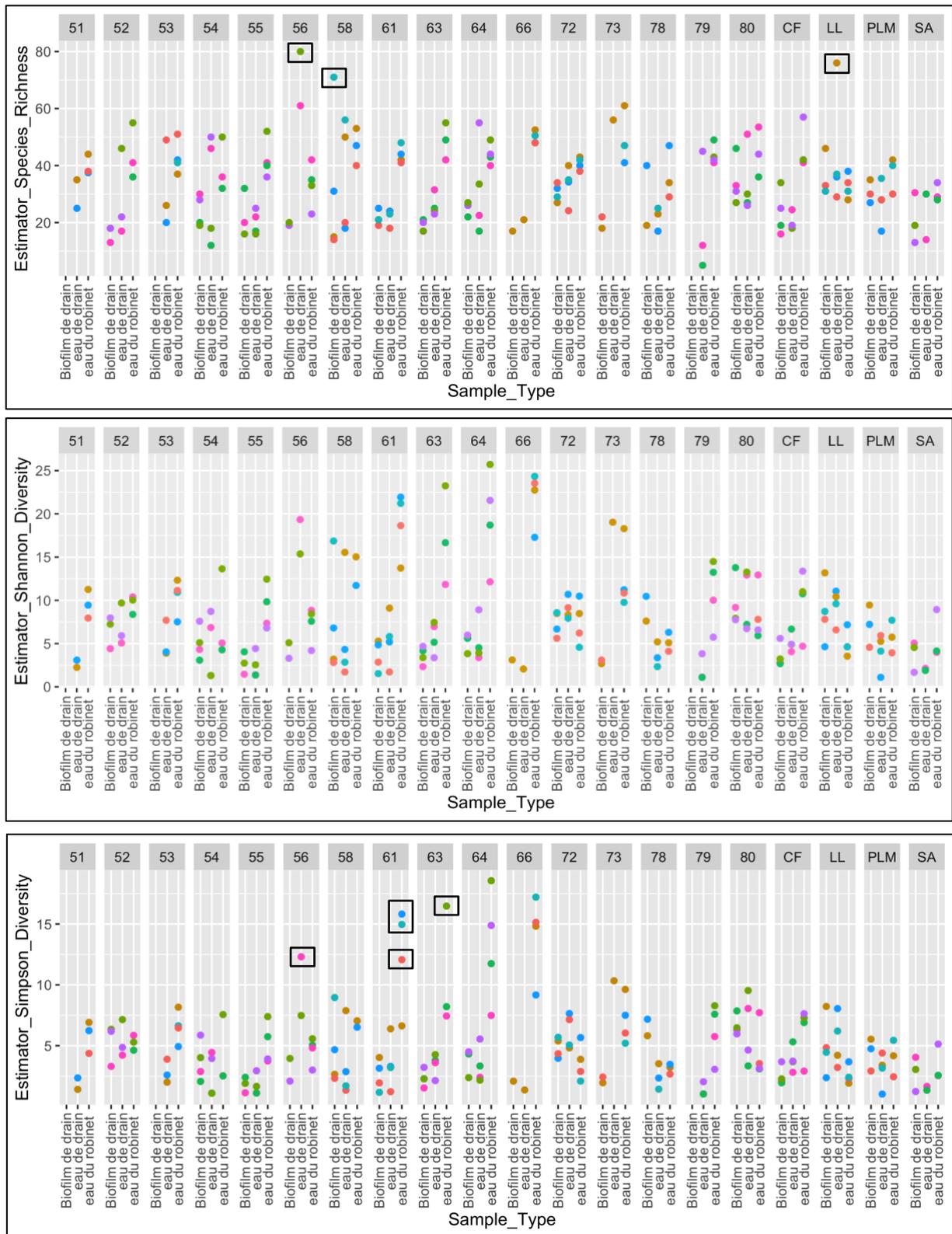


Figure 4-3 Répartition des données des différents indices alpha en fonction de la chambre, du type d'échantillon et de la date d'échantillonnage

A : Indice de diversité spécifique B : Indice de diversité de Shannon C : Indice de diversité de Simpson
 Points de couleur : Dates d'échantillonnage Cadre noir : Valeurs de diversité se démarquant des autres

Le biofilm de l'aérateur n'a pas été pris en compte dans ces analyses, la biomasse bactérienne étant trop faible dans ces échantillons pour en extraire l'ADN

4.3.2 Étude de la distribution des indices de diversités selon le type d'échantillon

L'intérêt de cette analyse est de comparer, dans un premier temps, chaque type d'échantillon entre eux afin d'identifier un lien au niveau des différents indices de diversité alpha entre les échantillons WF, WD et BD. Puis, dans un second temps, l'intention est de visualiser la distribution des indices de diversité en fonction du type d'échantillon et ainsi d'identifier le type d'échantillon ayant la diversité la plus importante. Les résultats montrent que la diversité alpha de l'eau du robinet était plus élevée que les deux autres types d'échantillons pour chaque niveau de diversité et encore plus particulièrement pour l'indice de diversité de Shannon (Figure 4-4).

Des tests de Dunn ont notamment été effectués pour établir un lien significatif entre la diversité des différents types d'échantillons pour chaque indice de diversité alpha. L'ensemble de ces tests indiquent qu'il n'y avait pas de différence significative entre les échantillons d'eau de drain et de biofilm de drain, et ce peu importe l'indice de diversité examiné (test de Dunn, $p > 0,05$). Par ailleurs, une différence significative de la diversité alpha a été observée pour les trois niveaux de diversité entre les échantillons de drain (eau et biofilm) et d'eau du robinet (test de Dunn, $p < 0,05$).

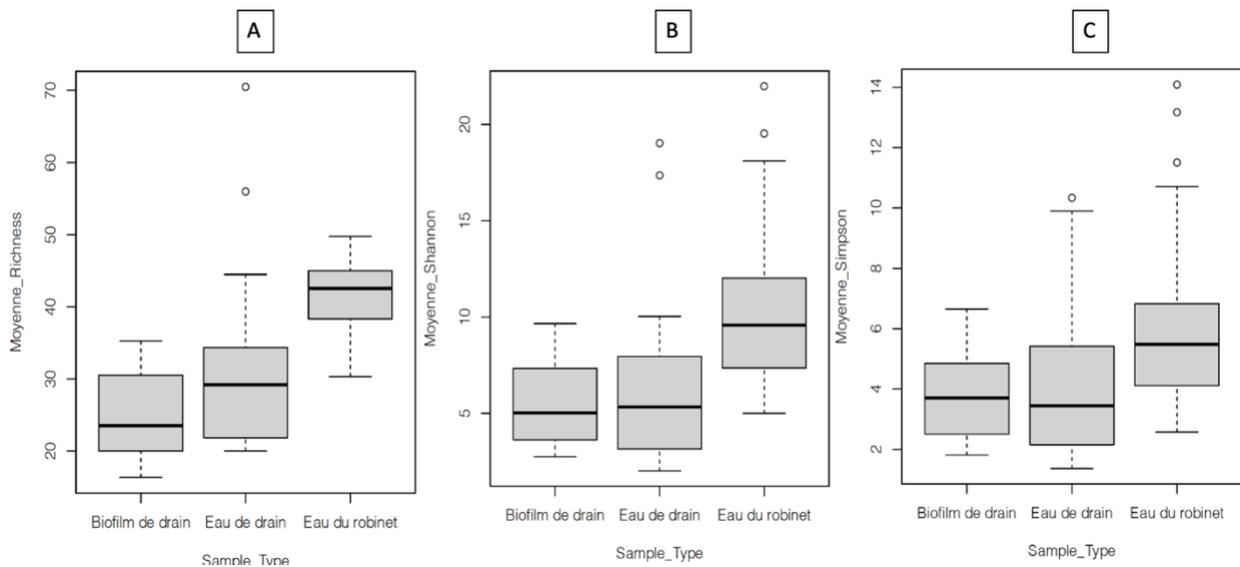


Figure 4-4 Représentation de la distribution des différents indices de diversité en fonction du type d'échantillon

A : Indice de diversité spécifique B : Indice de diversité de Shannon C : Indice de diversité de Simpson

4.4 Diversité Bêta

La diversité bêta compare le profil des communautés microbiennes entre différents échantillons. Cette comparaison se fait en tenant compte de la distribution de chaque ASV dans les échantillons comparés. D'un point de vue général, cette partie a été consacrée à l'identification des classes bactériennes ou encore des genres bactériens les plus abondants et spécifiques à un environnement donné. Cela a notamment permis de mettre en avant les différences et les ressemblances de diversité entre les échantillons environnementaux et ainsi d'identifier au mieux l'origine de la variation de la diversité entre ces échantillons.

4.4.1 Analyse du profil taxonomique

Cette analyse a dans un premier lieu permis d'identifier les classes bactériennes les plus abondantes présentes dans chaque échantillon puis dans un second temps d'étudier visuellement la variation de la diversité entre chacun de ces échantillons tout en identifiant deux facteurs expliquant au mieux la variabilité de cette diversité.

Tout d'abord, les classes des *Gammaproteobacteria*, des *Alphaproteobacteria* et des *Bacteroidia* étaient retrouvées dans tous les échantillons (Figure 4-5). De plus, l'abondance relative des *Gammaproteobacteria* apparaissait généralement plus élevée dans les drains contrairement aux *Alphaproteobacteria* qui paraissent plus abondantes dans l'eau du robinet. Il est notamment constaté que la classe des *Bacilli* est parfois retrouvée dans les échantillons de drains, or cette dernière n'est jamais présente dans les échantillons d'eau du robinet. Par ailleurs, les *Actinobacteria* et les *Gemmatimonadetes* sont présentes dans tous les échantillons d'eau du robinet mais pas dans tous les échantillons de drain. En effet, les *Actinobacteria* sont retrouvées dans quelques drains (eau et biofilm confondu) mais les *Gemmatimonadetes* sont retrouvées seulement dans certains échantillons d'eau de drain. Il est donc possible de supposer que cette classe de bactérie aurait une faible capacité à adhérer en biofilm.

Finalement, le profil de distribution des différentes classes bactériennes semble similaire dans l'eau du robinet. En effet, les mêmes classes bactériennes avec des abondances similaires sont retrouvées dans chaque échantillon d'eau du robinet. Cette observation ne peut cependant pas être appliquée aux échantillons de drains qui présentent un profil de distribution beaucoup plus variable d'un évier à l'autre.

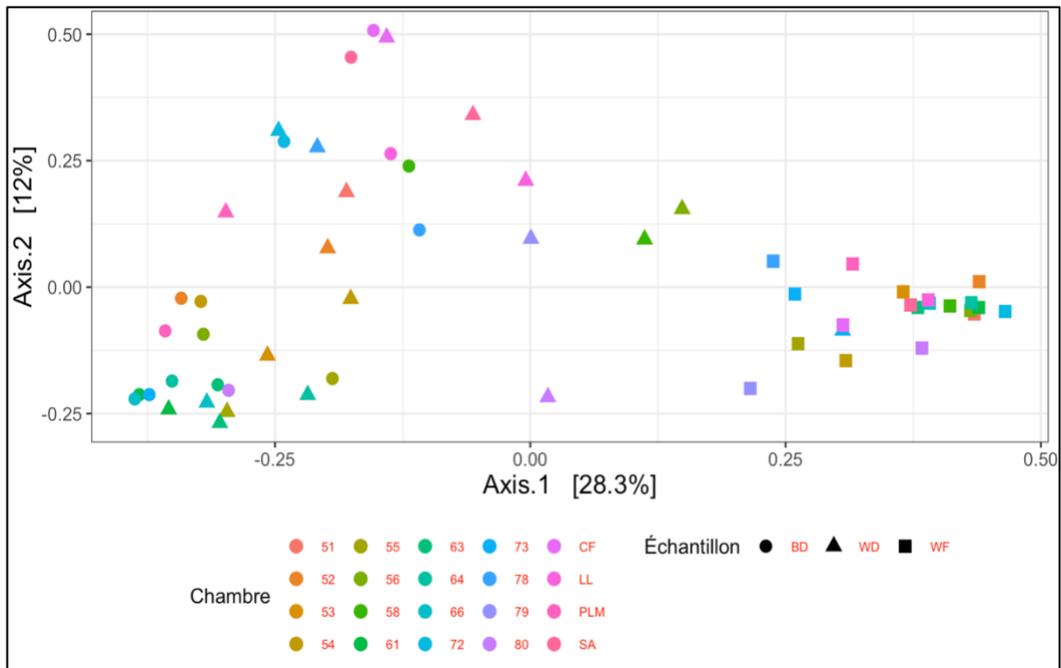


Figure 4-6 ACoP mettant en évidence la variation de la diversité entre les échantillons

4.4.2 Étude de la relation entre la différence de diversité des échantillons et les facteurs susceptibles d'expliquer cette variation

L'intention de cette analyse a été dans un premier temps d'identifier le pouvoir discriminant du facteur « chambre » et « type d'échantillon » au niveau de la diversité de l'ensemble des échantillons.

La PERMANOVA réalisée sur l'ensemble des échantillons démontre la présence d'une différence significative (PERMANOVA, $p < 0,05$) au niveau de la diversité entre les échantillons (Tableau 4-3) et que cette dernière est à la fois expliquée par la chambre et par le type d'échantillon. Par ailleurs, il est la chambre a une influence d'environ 37 % au niveau de cette variation et le type d'échantillon quant à lui assume son impact à 34 %. La part résiduelle, regroupant un large éventail d'autres facteurs expliquerait la différence de diversité à environ 29 %.

Tableau 4-3 Résultats de la PERMANOVA réalisée au niveau de l'ensemble des échantillons et prenant en compte à la fois le facteur type d'échantillon et le facteur chambre.

	P-value	Proportion d'explication
Chambre	0,001	0,37
Type d'échantillon	0,001	0,34
Facteurs résiduels	/	0,29

Une relation significative (PERMANOVA, $p < 0,05$) entre le type d'échantillon et la variation de la diversité a été mise en évidence pour toutes les comparaisons (Tableau 4-4). Dans le cas de la comparaison entre les échantillons WD et WF la différence de diversité est expliquée à environ 32 % par le type d'échantillon et à environ 68 % par les facteurs résiduels. La proportion des facteurs expliquant la variation de la diversité entre les échantillons BD et WF semble suivre le même schéma malgré le fait que la part d'influence du type d'échantillon est ici plus importante que pour cette comparaison. En effet, le type d'échantillon explique ici de manière significative la variation de la diversité entre BD et WF à 45 % contre 54 % expliquée par les facteurs résiduels.

Contrairement aux observations précédentes, la variation de la diversité entre les échantillons BD et WD est expliquée seulement à environ 6 % par le type d'échantillon contre environ 94 % par les facteurs résiduels. Ces observations ne semblent pas aberrantes de par le fait que les deux échantillons comparés proviennent du même environnement, soit le drain.

Tableau 4-4 Résultats des PERMANOVA réalisées sur des comparaisons deux à deux entre les types d'échantillons

	WF - WD		BD - WD		WF - BD	
	P-value	Proportion d'explication	P-value	Proportion d'explication	P-value	Proportion d'explication
Type d'échantillon	0,001	0,32	0,03	0,057	0,001	0,45
Facteurs résiduels	/	0,68	/	0,94	/	0,55

4.4.1 Identification de genres bactériens spécifiques à un environnement donné

Finalement, cette section a été la dernière traitant de l'analyse de la diversité bêta et a permis d'identifier les genres bactériens qui étaient spécifiques à un environnement donné, en prenant en compte ici la chambre et le type d'échantillon comme facteurs discriminants. En premier lieu, aucun genre bactérien n'a démontré une distribution spécifique à une chambre en particulier. Par ailleurs, 27 genres bactériens se sont avérés avoir une distribution spécifique à un type d'échantillon donné (Figure 4-7). Il est important de noter ici que malgré le fait que certains des 27 genres bactériens soient parfois retrouvés dans plusieurs types d'échantillons, une prédominance d'un environnement spécifique est toutefois toujours remarquée. Dans un premier lieu, 19 des genres bactériens étaient prédominants dans les échantillons WF. De plus, seulement sept de ces genres sont présents et en très faible proportion dans les échantillons BD qui est le type d'environnement le plus éloigné de l'eau du robinet. L'ensemble des 19 genres sont cependant retrouvés dans l'ensemble des échantillons WD. Cela ne semble pas surprenant car l'eau du robinet s'écoule directement dans le drain, il est donc attendu que les genres bactériens de

l'eau du robinet soient retrouvés dans l'eau du drain. La prédominance de certains genres dans les échantillons WD et BD est moins évidente à distinguer de par la forte similitude de leur niche écologique. Il est toutefois possible d'identifier trois genres majoritairement retrouvés dans les environnements WD et quatre dans les environnements BD. De plus, *Staphylococcus* est le genre bactérien marquant le plus sa prédominance dans un environnement donné en étant présent à plus de 95 % dans les échantillons WD. Par ailleurs, *Pseudomonas* est retrouvé en proportion quasiment équivalente entre l'eau du drain et le biofilm de drain avec une très légère prédominance dans le biofilm de drain. Finalement, trois genres bactériens étaient ubiquitaires et donc retrouvés dans 100 % des échantillons. Ces derniers correspondaient aux genres *Delftia*, *Elizabethkingia* et *Prheatoteobacter*. Ces genres bactériens ont préalablement été identifiés comme étant spécifiques à un type d'environnement ; cependant, comme le démontre la Figure 4-7, ces derniers sont effectivement ubiquitaires mais avec une prédominance dans un type d'échantillon donné.

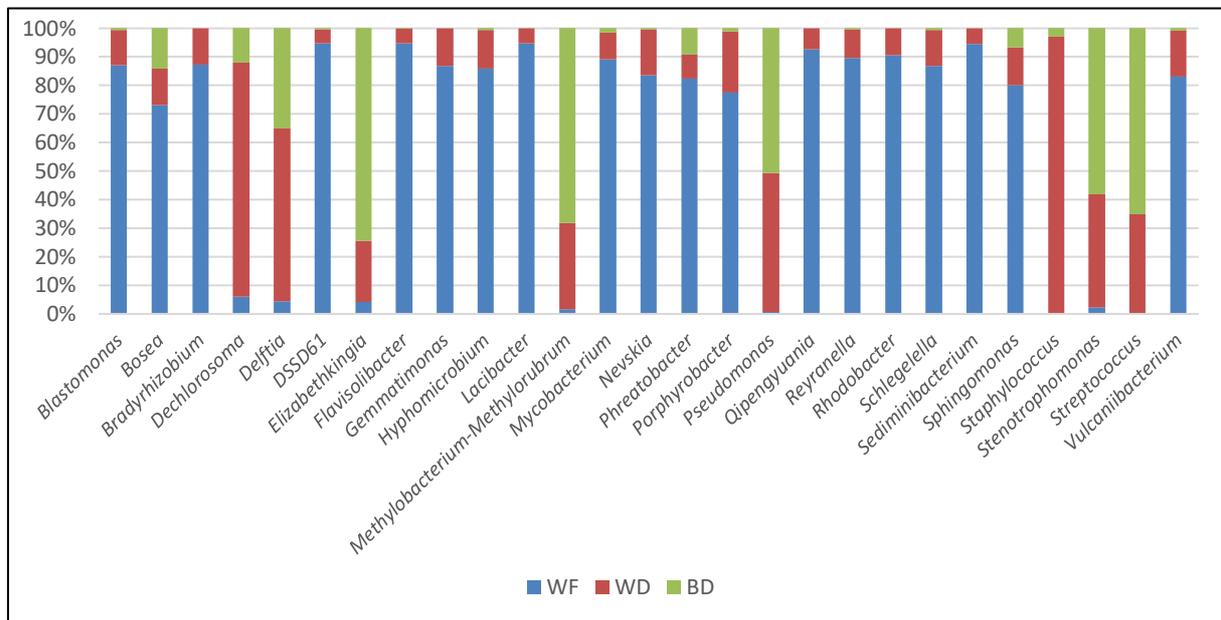


Figure 4-7 Identification de genres bactériens spécifiques à un environnement donné

4.5 Étude de la relation des communautés bactériennes et des paramètres physico-chimiques

Cette analyse a été consacrée à étudier la dynamique des communautés bactériennes de l'eau du robinet selon la physico-chimie. Pour ce faire, une db-RDA a été réalisée permettant ainsi la visualisation du profil de distribution des communautés bactériennes en fonction des paramètres physico-chimiques (Figure 4-8). Ainsi, deux axes significatifs (ANOVA, $p < 0,05$), CAP 1 et CAP 2 permettant d'expliquer respectivement à 42 % et à 29 % la relation entre les communautés et la physico-chimie ont été identifiés. La dynamique observée pour les paramètres physico-chimique est similaire à celle de la section 4.1 excepté pour le pH et l'oxygène dissous. En effet, le chlore (total et résiduel) et la conductivité semblent de nouveau opposés à la température et à la turbidité. Cependant, le pH et l'oxygène dissous qui présentaient une trajectoire opposée dans la section 4.1 sont maintenant orientés dans la même direction laissant ainsi suggérer que certains ASV sont à la fois retrouvés dans les échantillons possédant un pH élevé et ceux avec une forte concentration en oxygène dissous. De plus, la grande majorité des ASV non centroïdes sont orientés autour de la trajectoire de l'oxygène dissous, le pH, la turbidité et la température impliquant ainsi une corrélation positive entre ces derniers. Cependant, très peu d'ASV semblent corrélés positivement au chlore et à la conductivité. Finalement, un regroupement d'ASV paraît opposé au pH et à l'oxygène dissous laissant alors suggérer une corrélation négative entre ces derniers.

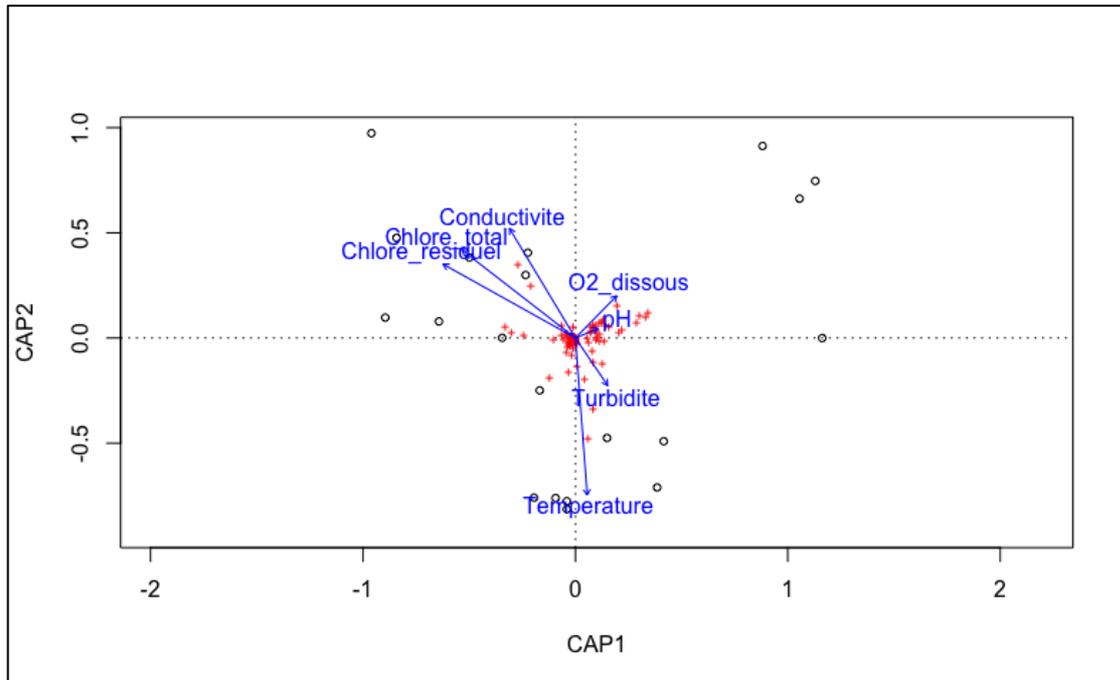


Figure 4-8 db-DRA illustrant la dynamique des ASV en fonction de la physico-chimie de l'eau
Croix : ASV Flèches : Trajectoire des paramètres physico-chimiques Cercles : Échantillons

4.6 Étude de la dynamique de distribution des PO dans l'environnement évier selon la diversité bactérienne et la physico-chimie

Cette analyse a permis de mettre en relation l'ensemble des analyses réalisées jusqu'à présent avec la présence ou non de PO dans les éviers afin de déterminer si la niche écologique de l'environnement évier et sa physico-chimie permettent d'expliquer le profil de distribution des PO.

4.6.1 Étude de la corrélation entre les indices de diversité alpha et l'occurrence des pathogènes dans les échantillons

Cette analyse a été consacrée, par le biais de tests de corrélations à établir une relation potentielle entre la diversité alpha des communautés microbiennes et la présence ou l'absence des PO d'intérêts de l'étude dans les échantillons. Une matrice de corrélation (Figure 4-9) a permis de rendre compte visuellement d'une association plus ou moins forte, positive ou négative entre les indices de diversité et les pathogènes. Des tests de corrélation de Spearman ont notamment été effectués en parallèle afin d'être informé sur la significativité de ces interactions. Dans un premier temps, la détection de *P. aeruginosa* est corrélée négativement à l'ensemble des indices de diversité alpha. Cependant, seule la corrélation entre *P. aeruginosa* et l'indice de diversité de Shannon s'est avérée être significative (Spearman, $p < 0,05$). La présence de *P. aeruginosa* est donc corrélée significativement et négativement avec les espèces abondantes. Les mêmes observations s'appliquent à *S. marcescens* et *S. maltophilia*. En effet, il peut de la même manière être noté que ces derniers pathogènes sont associés négativement, de manière plus ou moins forte à l'ensemble des indices de diversité alpha. Cependant, et contrairement à *P. aeruginosa*, la nature de la corrélation entre ces derniers pathogènes et les indices de diversité alpha s'est avérée être significative uniquement avec la richesse spécifique (Spearman, $p < 0,05$) et cette relation est davantage marquée pour *S. maltophilia* (Spearman, $p < 0,01$). La présence de *S. marcescens* et *S. maltophilia* est donc corrélée négativement avec les communautés comportant un grand effectif d'espèces rares. Finalement, une association positive entre les profils de détection des trois PO peut être observée. En effet, *S. maltophilia* était fortement corrélé à *S. marcescens* et *P. aeruginosa* (Figure 4-9). Le test de Spearman révèle en effet une très forte association positive entre *S. maltophilia* et *S. marcescens* (Spearman, $p < 0,001$). Une corrélation positive (Spearman, $p < 0,05$) a également été observée entre *S. maltophilia* et *P. aeruginosa*. Par ailleurs aucune association significative n'a été observée entre *S. marcescens* et *P. aeruginosa*.

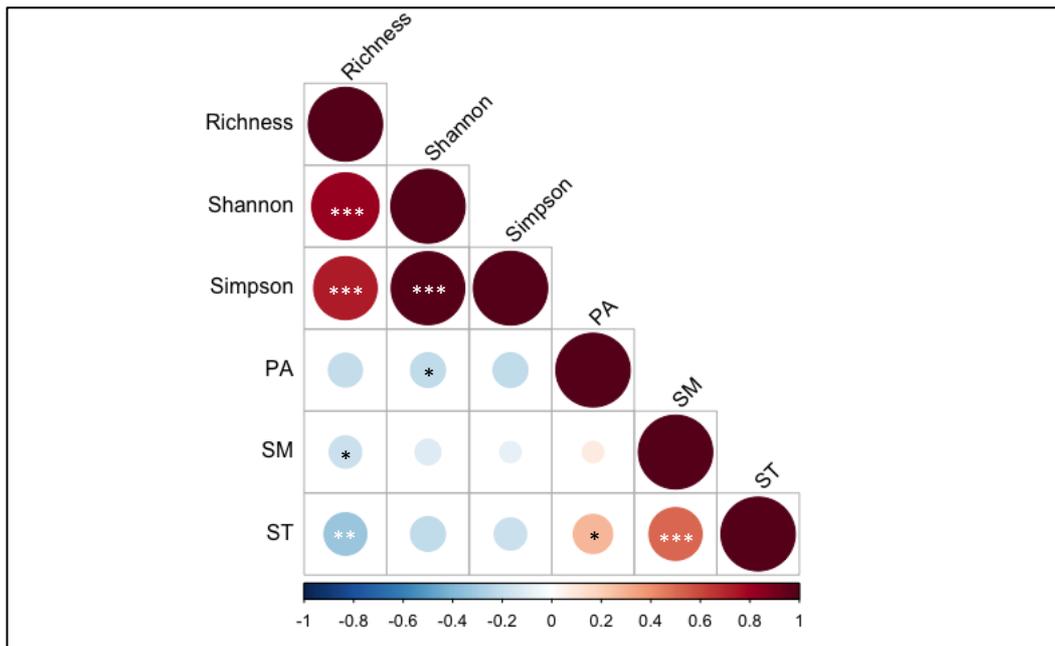


Figure 4-9 Matrice de corrélation entre les indices de diversité alpha et les PO

*** = p-value < 0.001 ** = p-value < 0.01 * = p-value < 0.05

4.6.2 Étude de la relation entre les PO d'intérêts et la diversité bêta

Cette section a été consacrée à évaluer le lien existant entre la distribution des PO et la structure des communautés microbiennes. L'examen de cette relation repose sur une ordination des échantillons dans un espace réduit où la différence entre les profils de communautés microbienne exprimée par une distance Bray-Curtis est contrainte par la matrice de distribution des PO.

Dans un premier temps, deux axes ont été identifiés (CAP1 et CAP2) permettant d'expliquer au mieux la relation entre les PO et la structure des communautés microbiennes des échantillons (Figure 4-10). Le premier axe est surtout défini par la distribution de *S. maltophilia* dans les échantillons alors que le second reflète davantage la covariation des communautés microbiennes avec la distribution de *P. aeruginosa*. Ces deux derniers axes expliquent respectivement à 14,75 % et 0,04 % la variation des communautés microbiennes. La covariation entre le profil de distribution des PO et de la structure des communautés microbiennes dans l'espace réduit défini par les deux axes est significative (ANOVA, $p < 0.05$). Un premier constat émanant de l'analyse est la différente trajectoire empruntée par les trois PO. En effet, les vecteurs correspondant à *S. maltophilia* et *S. marcescens* sont orientés dans la même direction qui s'oppose à celle de *P. aeruginosa*. Cette observation est en adéquation avec le patron de corrélation des trois PO avec la diversité alpha des communautés microbiennes où *P. aeruginosa* se distinguait des deux autres PO. De nombreux ASV sont orientés dans la même direction que *S. marcescens*, *S. maltophilia* et *P. aeruginosa* ce qui pourrait alors révéler une corrélation positive entre ces pathogènes et les ASV en question. Cependant, il semblerait que de nombreux ASV soient orientés

en sens opposés à la trajectoire de *S. maltophilia* suggérant donc une corrélation fortement négative entre *S. maltophilia* et ces ASV. De plus il est à noter que la corrélation négative observée est majoritairement voire uniquement expliquée par CAP 1 qui possède le plus grand pouvoir d'explication. Il a été possible d'identifier 6 ASV se démarquant des centroïdes (Figure 4-10) dont l'affiliation taxonomique est présente dans le tableau 4-5. Parmi ces ASV, ceux identifiés par les lettres A, B et C semblent orientés dans la même trajectoire que *S. maltophilia* et *S. marcescens* alors que les ASV D, E et F sont orientés dans leur direction opposée. Cette observation est davantage marquée pour *S. maltophilia*.

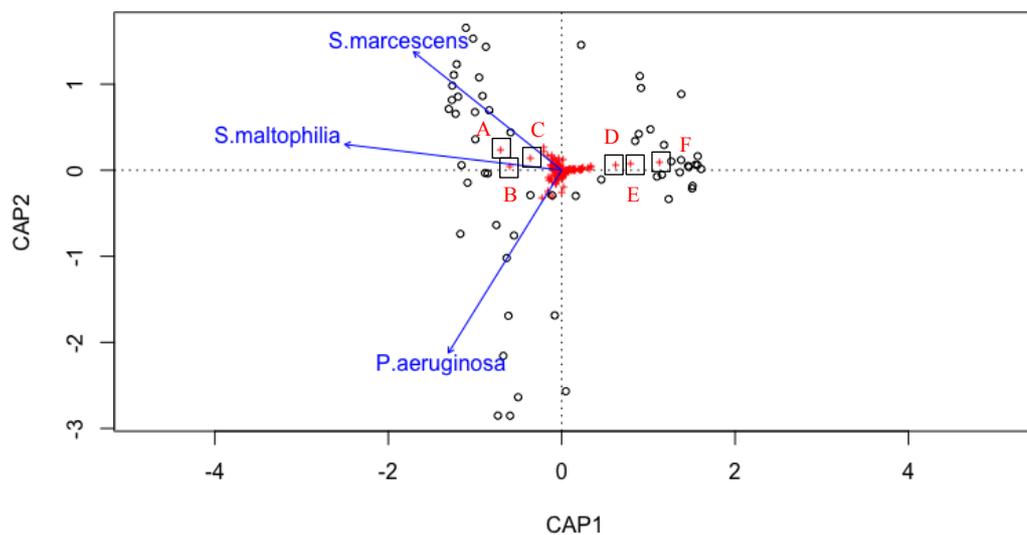


Figure 4-10 db-RDA illustrant la relation entre les pathogènes et la diversité bêta des échantillons

Cercle : Échantillons Croix : ASV Flèches : Trajectoire des pathogènes
Cadre noir + lettres : ASV se démarquant du centroïde

Parmi les ASV non centroïdes d'intérêts (Tableau 4-5), cinq appartiennent à l'embranchement des *Proteobacteria* et un autre aux *Bacteroidetes*. La classe bactérienne majoritairement retrouvée est celle des *Alphaproteobacteria* suivi des *Gammaproteobacteria*. De plus, les ASV 1 et 4 semblent taxonomiquement proches puisqu'ils appartiennent à la même famille des *Comamonadaceae*, cependant ces derniers diffèrent par leur genre bactérien. Finalement, suivant la même tendance que précédemment, les ASV 2 et 5 appartiennent à la même famille (l'identification de l'ASV 5 n'a pas pu être effectuée jusqu'au genre bactérien).

Tableau 4-5 Identification taxonomique des principaux ASV identifiés préalablement

Identification	ASV	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre
A	ASV_3	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Weeksellaceae</i>	<i>Elizabethkingia</i>
B	ASV_1	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Delftia</i>
C	ASV_6	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>
D	ASV_5	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	NA
E	ASV_4	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Schlegelella</i>
F	ASV_2	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i>

Des corrélations de Spearman ont été effectuées entre les ASV non centroïde d'intérêt et les trois PO (Tableau 4-6). Dans un premier temps, il s'est avéré que *S. marcescens* et *S. maltophilia* étaient corrélés de manière significative à l'ensemble des ASV identifiés (Spearman, $p < 0,05$), excepté le genre *Delftia* pour *S. marcescens*. De plus, les ASV correspondant au genre *Schlegelella*, *Sphingomonas* et à la famille des *Sphingomonadaceae* sont corrélés négativement à ces deux PO et ce de façon davantage marquée pour *S. maltophilia* (Spearman, $p < 0,001$). Au contraire les ASV appartenant aux genres *Elizabethkingia*, *Delftia* et *Methylobacterium-Methylorubrum* sont corrélés positivement à *S. marcescens* et *S. maltophilia*, il n'est cependant pas possible de conclure quant à cette corrélation pour *Delftia* et *S. marcescens*. Dans un second temps, il est observé que *P. aeruginosa* est corrélé de manière significative (Spearman, $p < 0,05$) à seulement deux de ces ASV, le genre *Schlegelella* et celui appartenant à la famille des *Sphingomonadaceae*. Par ailleurs, chacune de ces corrélations s'est avérée être négative.

Tableau 4-6 Résultats des tests de corrélation de Spearman réalisés sur les PO d'intérêts et les différents ASV identifiés préalablement

	<i>Serratia marcescens</i>		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	p-value	Coefficient rho	p-value	Coefficient rho	p-value	Coefficient rho
<i>Delftia</i>	0.08	0.23	0.007	0.35	0.3	0.13
<i>Sphingomonas</i>	0.003	-0.38	5.01e-09	-0.68	0.06	-0.25
<i>Elizabethkingia</i>	0.0009	0.42	1.935e-05	0.53	0.3	0.11
<i>Schlegelella</i>	0.001	-0.40	7.116e-07	-0.60	0.01	-0.32
<i>Sphingomonadaceae</i>	0.005	-0.36	2.117e-08	-0.66	0.001	-0.40
<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	0.001	0.41	0.0002	0.46	0.3	0.13

4.6.3 Étude de la relation entre les pathogènes et la physico-chimie

Cette analyse a été réalisée dans le but de déterminer quelles variables physico-chimiques covariaient avec la détection des PO dans les échantillons de drains. En premier lieu, un test de Dunn a été effectué démontrant que le profil de distribution des pathogènes ne variait significativement pas entre les échantillons WD et BD ($p < 0,05$) ; cependant une différence significative a pu être observée entre les échantillons de drain (WD et BD) et d'eau du robinet ($p > 0,05$). Ainsi, étant donné qu'il a été élucidé dans la section 4.2 que l'occurrence des pathogènes dans les échantillons de drain était plus importante que dans les échantillons d'eau du robinet, il a été décidé de travailler avec la moyenne des ASV dans l'eau du drain et du biofilm pour la suite des analyses.

Une matrice de corrélation (Figure 4-11) a permis d'identifier les relations significatives entre l'occurrence des pathogènes dans les échantillons de drains et les paramètres physico-chimiques de ces environnements. Tout d'abord, une forte corrélation négative a été observée entre *S. maltophilia* et le chlore résiduel et total. Une relation positive a notamment été mise en évidence pour *S. maltophilia* et *S. marcescens*, cependant, cette relation n'a pas pu être appliquée entre *S. maltophilia* et *P. aeruginosa* contrairement à la section 4.5.1 où une corrélation positive entre ces deux pathogènes pouvait être observée. De plus, il s'est avéré que *P. aeruginosa* était associé négativement à l'oxygène dissous et qu'une relation similaire était observée entre le pH et *S. marcescens*. Par ailleurs, une forte corrélation négative entre la température et le chlore résiduel et total a été révélée. Cette observation permet ainsi de confirmer la relation opposée de ces paramètres observée en section 4.1.

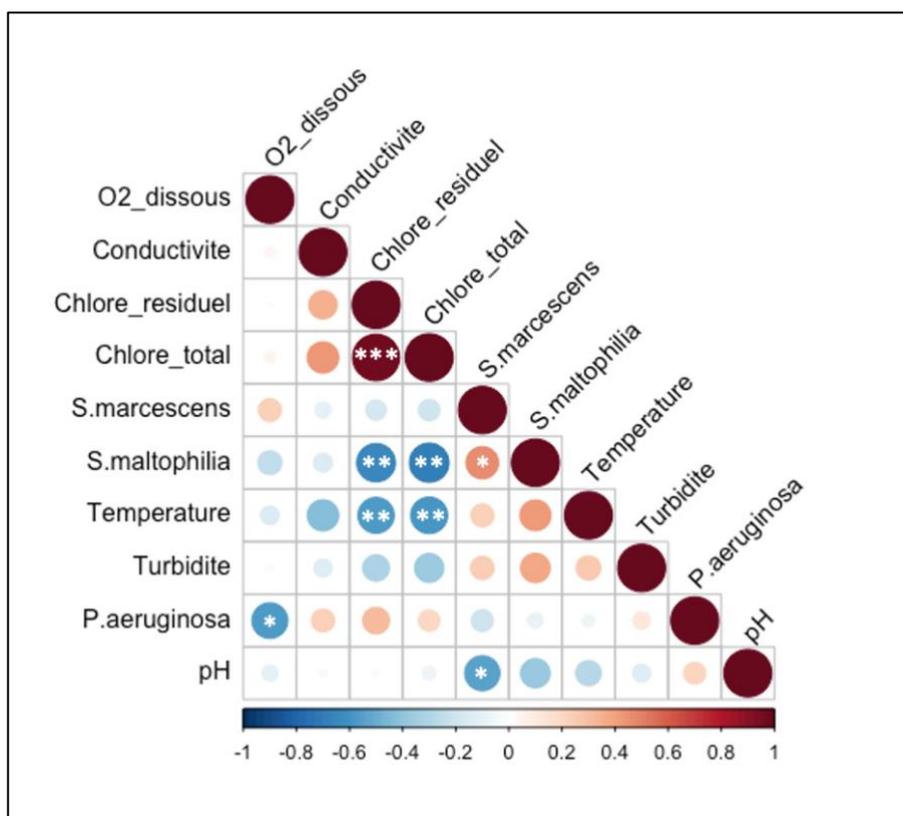


Figure 4-11 Matrice de corrélation illustrant de la relation entre la physico-chimie et l'occurrence des PO

*** = p-value < 0.001 ** = p-value < 0.01 * = p-value < 0.05

4.6.4 Explication du profil de distribution des pathogènes selon la communauté bactérienne et la physico-chimie

Finalement, une analyse du partitionnement de la variation a permis de conclure ce projet en examinant la contribution de l'occurrence de PO dans les évier et des paramètres physico-chimiques pour expliquer la variation de la structure des communautés microbiennes. Il s'est avéré que les communautés bactériennes et la physico-chimie covariaient avec les PO, expliquant respectivement à 44 % et 26 % la distribution des PO dans les évier (Figure 4-12). Par ailleurs, ces résultats permettent de démontrer que les communautés bactériennes ont une relation plus forte avec le profil de distribution des PO dans les échantillons que la physico-chimie. Il est à noter que la matrice d'ASV et celle de la physico-chimie sont complémentaires puisqu'une redondance de 8 % est observée pour ces deux matrices. La part résiduelle possède quant à elle une part d'explication de 22 %.

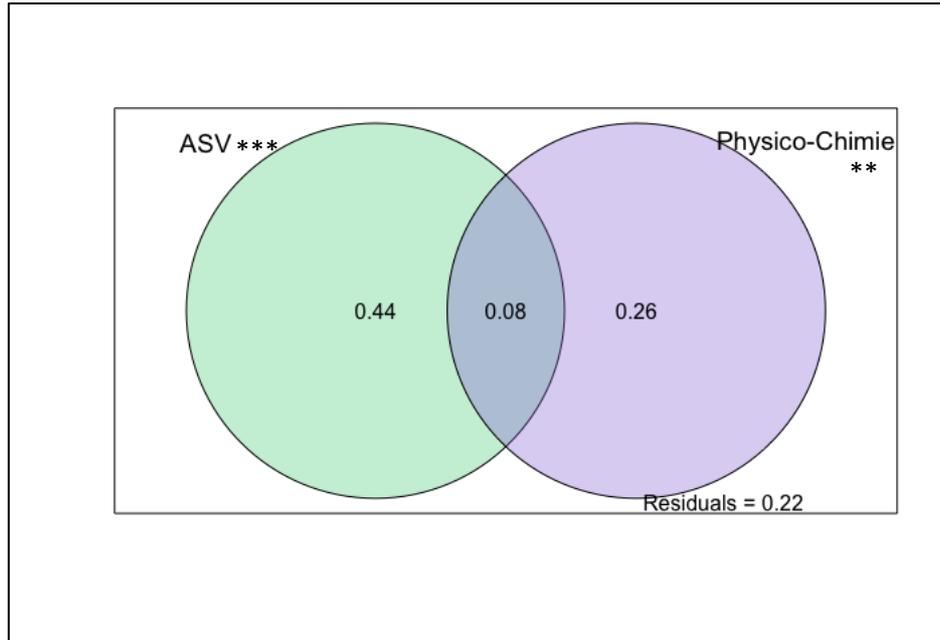


Figure 4-12 Diagramme de Venn illustrant la contribution de la structure des communautés microbiennes (ASV), de la physico-chimie et de la combinaison des deux matrices pour expliquer le profil de distribution des POs dans les éviers.

*** = p-value < 0.001 ** = p-value < 0.01

5 DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce projet consistait à établir une potentielle relation entre la niche écologique de l'environnement évier, les paramètres physico-chimiques de l'eau et l'occurrence des PO dans les éviers afin mieux identifier les facteurs favorisant l'émergence de ces mêmes PO.

En premier lieu, certains paramètres physico-chimiques de l'eau avaient un impact important au niveau de la distinction entre les différents environnements échantillonnés. En effet, cette étude a permis de mettre en évidence que le chlore résiduel et le pH étaient les variables qui distinguaient le plus les différents échantillons. De plus, la température et la turbidité avaient une relation inverse avec le chlore et la conductivité. Cette relation opposée entre la température et le chlore a déjà été mis en avant dans de nombreuses études. En effet, une élévation de la température de l'eau est associée à une chute de la concentration en chlore résiduel et total favorisant ainsi la prolifération microbienne (Torvinen et al. 2007, Zlatanović et al. 2017, Tang et al. 2020, Zhou et al. 2021). Par ailleurs, la grande majorité des ASV était orientée autour de la température, du pH, de la turbidité et de l'O₂ dissous mais très peu étaient corrélés positivement au chlore et à la conductivité. De précédentes études ont révélé des résultats similaires, en effet, ces dernières ont démontré que la diversité bactérienne était positivement corrélée au pH, à la température, à la turbidité et que la présence de Protéobactéries était associée à l'O₂ dissous (Zhou et al. 2021). De plus, il s'avère que le nombre de copie du gène de l'ARNr 16S est négativement corrélé au chlore mais positivement corrélé à la température et au pH (Wei et al. 2017). La forte association négative entre le chlore et *S. maltophilia* permet d'ailleurs d'appuyer les tendances préalablement documentées. Cependant, les résultats découlant de cette étude ont notamment démontré qu'un regroupement d'ASV semblaient associés négativement au pH et à l'oxygène dissous. De plus, *P. aeruginosa* et *S. marcescens* étaient respectivement associés négativement à l'oxygène dissous et au pH. En effet, des conditions microaérophiles sont favorables au développement de *P. aeruginosa* en biofilm (Borriello et al. 2004). L'ensemble des résultats documentés dans les précédentes études et ceux obtenus lors de ce projet démontrent ainsi l'importance de l'impact des facteurs physico-chimiques sur le développement de communautés microbiennes qui pourraient ultimement contribuer à fournir une niche favorable ou non favorable pour les pathogènes.

Les drains sont connus pour être un réservoir important de pathogènes (Gilbert et al. 2010, Lalancette et al. 2017, Muyldermans et al. 2021). En effet, les données découlant de cette étude ont révélé que les trois PO d'intérêts étaient principalement retrouvés dans les échantillons de biofilms et d'eau de drains suggérant donc que le drain est un des réservoirs principaux de ces PO. Selon le meilleur des connaissances des membres de l'équipe, ce portrait simultané des trois PO en utilisant des outils moléculaires hautement spécifiques constitue un résultat inédit. Des investigations menées sur *P. aeruginosa* ont démontré que les drains étaient en grandes parties contaminés par ce dernier par rapport au biofilm de l'évier et à l'eau du robinet (Lalancette et al. 2017). Par ailleurs, les drains ont été identifiés

comme une des sources principales de transmission de *S. marcescens* chez les nouveau-nés (Muyldermans et al. 2021). De plus, de nombreuses études réalisées sur *S. maltophilia* ont permis de révéler que le drain était l'un de ses principaux réservoirs (Gilbert et al. 2010, Paopradit et al. 2017). *S. maltophilia* a été le pathogène le plus isolé de l'étude avec un taux d'occurrence de 64 % dans les éviers sur la durée de l'échantillonnage et Gilbert et al. ont identifié *S. maltophilia* comme étant le micro-organisme ayant été le plus isolé au sein du biofilm de drain d'un hôpital (Gilbert et al. 2010, Paopradit et al. 2017). Plusieurs facteurs tels que le débit, les matériaux des aérateurs, le désinfectant résiduel présent dans l'eau ou encore la faible concentration en nutriments dans l'eau du robinet peuvent expliquer pourquoi les pathogènes ont une capacité plus importante à se maintenir dans un drain (Lalancette et al. 2017). De plus, l'eau présente au niveau du drain est stagnante favorisant alors la formation de biofilm et l'ensemble des germes pathogènes étant présents sur les mains du personnel ou des visiteurs se retrouvent directement déversés dans le drain lors du lavage des mains. Par ailleurs, la transmission des pathogènes du drain aux nouveau-nés serait indirect car ces derniers ne sont jamais en contact direct avec le drain, une des explications la plus probable de cette transmission est alors celle par les mains du personnel hospitalier ou bien des parents (Muyldermans et al. 2021). Une des voies de contamination des pathogènes présents au niveau des drains est la production d'aérosols. En effet, le jet d'eau du robinet se déversant dans le drain favorise la production d'aérosols pouvant ainsi provoquer l'aérosolisation des pathogènes présents au niveau du drain. Il a d'ailleurs déjà été révélé qu'une des voies de transmission de *P. aeruginosa* et de *S. maltophilia* était par production d'aérosols durant le lavage des mains dans les hôpitaux (Gilbert et al. 2010).

La présente étude a permis de révéler une association positive et significative de *S. maltophilia* avec *P. aeruginosa* et *S. marcescens* lorsque l'ensemble des échantillons étaient pris en compte. Cette observation est très intéressante car cette tendance a déjà été documentée dans la littérature (Kataoka et al. 2003, Kataoka et al. 2003, de Abreu et al. 2014, Yin et al. 2017). De par leurs investigations, Yin et al. ont mis en évidence que les taux de mortalité et d'hospitalisation se retrouvaient augmentés lors d'une co-infection à *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*. De plus, une co-culture de ces deux bactéries avait un effet synergique sur la formation de biofilms par 102 fois par rapport à une culture seule. Une autre étude a permis de révéler que *P. aeruginosa* et *S. marcescens* étaient les deux pathogènes les plus fréquemment isolés à partir du même échantillon que *S. maltophilia* sur des patients hospitalisés. *S. maltophilia* a ainsi pu être considéré comme un agent indirect favorisant le maintien et la survie de *S. marcescens* et *P. aeruginosa* (Kataoka et al. 2003, Kataoka et al. 2003). En effet, certaines investigations ont établi que *S. maltophilia* était favorable à la croissance de *P. aeruginosa* et *S. marcescens* en leur permettant de survivre à de forte concentration d'imipénem ou de ceftazidime grâce à la production de sa lactamase (Kataoka et al. 2003, Kataoka et al. 2003). De plus, *S. maltophilia* aurait la capacité d'augmenter la pathogénicité de *P. aeruginosa* en stimulant la production de ses gènes de virulence (Yin et al. 2017). Cependant, lorsque seuls les échantillons de drains ont été pris en compte dans l'analyse

des résultats de cette étude, aucune relation significative n'a été observé entre *S. maltophilia* et *P. aeruginosa*. Cela est probablement dû à une baisse du degré de liberté causée par une diminution des observations prises en compte.

L'étude de la diversité de l'environnement évier est importante car sa composition peut avoir une influence sur le développement et le maintien des pathogènes. Les résultats obtenus par cette étude ont dans un premier temps permis d'identifier l'eau du robinet comme étant l'environnement démontrant la diversité la plus importante, que ce soit pour les espèces faiblement abondantes, abondantes ou très abondantes, contrairement au biofilm de drain qui possédait la diversité la moins importante. Ce phénomène n'est pas surprenant et peut être expliqué par le fait que toutes les bactéries n'ont pas la capacité à adhérer en biofilm (Inkinen et al. 2016). Cependant, il est ici difficile d'expliquer pourquoi la diversité dans l'eau du robinet est plus importante que dans l'eau du drain. En effet, il existe des études relatant de la diversité dans les éviers et d'autres de la diversité dans les drains, mais selon le meilleur de notre connaissance aucune ne s'est intéressée à étudier les deux en parallèle. De plus, les valeurs de diversité alpha sont très variables d'une étude à une autre, il est donc très difficile de se positionner par rapport à ce qui a préalablement été observé. Effectivement, les indices de richesse spécifique retrouvés dans la littérature s'étendaient de 9 à 580 selon l'investigation réalisée (Revetta et al. 2010, Revetta et al. 2011, Henne et al. 2012, Dzieciol et al. 2016, Inkinen et al. 2016). Les causes de cette forte variation sont inconnues mais il est possible de supposer que les techniques de séquençage et d'analyses bioinformatiques, la source d'eau, les désinfectants utilisés, les matériaux des systèmes de distribution d'eau ou encore les périodes de stagnation peuvent contribuer à expliquer les différences observées. Les indices de richesses spécifiques obtenus dans cette étude sont quant à eux compris entre environ 10 et 70 ce qui ne semble donc pas aberrant par rapport aux indices retrouvés dans la littérature. De plus, il s'est avéré que la diversité dans l'eau du robinet était beaucoup plus stable que dans les échantillons de drains. Cela peut donc révéler une adaptabilité et une résistance des bactéries présentes dans l'eau du robinet aux stress environnementaux et au désinfectant résiduel (Vaz-Moreira et al. 2017, Dias et al. 2019). Par ailleurs, le contrôle et la surveillance des populations bactériennes d'un drain est un défi car tel qu'observé dans cette étude, ces dernières sont dynamiques et cette variation peut être expliquée par divers facteurs comme le lavage des mains, les nutriments présents ou encore les résidus déversés dans le drain (Dzieciol et al. 2016). Ainsi ces derniers constituent un réservoir important de pathogènes.

Les Protéobactéries ont été retrouvées en majeure proportion dans les échantillons avec une prédominance des Alphaprotéobactéries et des Gammaprotéobactéries. Les Protéobactéries ont toujours été l'embranchement dominant dans les échantillons d'eau, que ce soit à la source ou encore au point d'utilisation (McBain et al. 2003, Inkinen et al. 2016, Vaz-Moreira et al. 2017, Dias et al. 2019, Tang et al. 2020, Zhou et al. 2021). Cependant, les classes de Protéobactéries prédominantes ne sont pas toujours les mêmes d'une étude à une autre. En effet, dans certains cas les Alpha et les Bêta protéobactéries

étaient retrouvées en majeure proportions alors que dans d'autres cas les Alpha et les Gamma protéobactéries étaient majoritaires (Lu et al. 2013, Vaz-Moreira et al. 2014, Inkinen et al. 2016, Vaz-Moreira et al. 2017, Dias et al. 2019). Ces différences peuvent être expliquées par un large éventail de facteurs environnementaux tel que la température, le désinfectant résiduel utilisé, la diversité microbienne présente à la source ou encore les matériaux des éviers et des drains (Lu et al. 2013, Vaz-Moreira et al. 2014, Roeselers et al. 2015, Dias et al. 2019). Par ailleurs, les Protéobactéries sont un groupe dont les bactéries résistantes aux antibiotiques sont prédominantes dans l'eau potable (Vaz-Moreira et al. 2017). Cela favorise ainsi le transfert de gènes de résistance entre les bactéries, faisant de l'eau du robinet un réservoir important d'antibiorésistance, soulignant une fois de plus l'importance de contrôler les populations microbiennes de l'eau.

Selon une étude menée par (Dzieciol et al. 2016) les principaux embranchements identifiés dans les drains étaient les Proteobactéries, les Firmicutes et les Bacteroidetes, avec une prédominance des Protéobactéries et des Firmicutes dans l'eau du drain et des Protéobactéries et des Bacteroidetes dans le biofilm du drain. Les résultats obtenus dans cette étude semblent concorder avec ces observations. En effet, les *Bacilli*, appartenant au phylum des *Firmicutes*, ont majoritairement été retrouvés dans les échantillons d'eau de drain alors que les *Bacteroidia*, bien qu'elles étaient présentes dans tous les échantillons, étaient présentes en plus grande proportion dans les échantillons de biofilm de drain. Par ailleurs, les Alphaprotéobactéries étaient majoritairement retrouvés dans les échantillons d'eau du robinet alors que les Gammaprotéobactéries étaient plus abondantes dans les échantillons de drain, eau et biofilm confondus. Les Alphaprotéobactéries sont une classe de bactéries préférant les environnements pauvres en nutriments, c'est pourquoi elles ont une facilité à se développer et à se maintenir dans l'eau du robinet (Vaz-Moreira et al. 2017). Cependant, les Gammaprotéobactéries sont constitués d'un large groupe de bactéries fréquemment associés aux environnements touchés par l'homme (Vaz-Moreira et al. 2017). Or, les drains sont un environnement directement associé à l'homme puisque lors du lavage des mains l'ensemble des résidus sont directement déversés dans le drain.

La diversité microbienne de l'eau du robinet a facilement pu être distinguée des échantillons de drains et ce de façon significative par le type d'échantillon. Or, cette distinction est difficilement applicable pour les échantillons de drain entre eux. En effet, le type d'échantillon était responsable de seulement 3 % des différences de diversité observées entre les échantillons de biofilm de drain et d'eau de drain, rendant ainsi cette distinction négligeable. Ces résultats ne semblent pas surprenants car l'eau du robinet provient d'un environnement différent du biofilm et de l'eau de drain. Cependant, le biofilm et l'eau du drain proviennent du même environnement, ce qui peut expliquer pourquoi leur diversité est difficilement distinguable. De plus, les biofilms sont des structures dynamiques constitués d'agrégats qui peuvent se décrocher et ainsi se retrouver sous forme planctonique (Zhang et al. 2018). C'est pourquoi une diversité similaire a pu être observée entre les biofilms de drains et l'eau des drains.

De précédentes études ont révélé l'importance de l'interaction entre la niche écologique de l'environnement évier et les PO pouvant être maintenus à l'intérieur (Szewzyk et al. 2000, Simões et al. 2007, Tang et al. 2020). Les données découlant de ce projet supportent ces observations car des corrélations ont pu être mise en évidence entre les PO d'intérêts et certains ASV. Plus particulièrement, de très fortes corrélations ont été observées entre *S. maltophilia* et des ASV dont les plus importantes étaient négatives. Les interactions au sein d'une niche écologique peuvent être de plusieurs natures, allant de la compétition à la coopération (Szewzyk et al. 2000, Simões et al. 2007). Dans une relation compétitive, les bactéries seraient en rivalité pour des nutriments alors qu'en coopération ces dernières auraient des actions synergétiques. Par exemple, dans un milieu oligotrophe, les bactéries ayant besoin de peu de nutriments se développeraient en premier supportant ensuite d'autres microorganismes ayant des besoins nutritifs complémentaires de survivre dans ce milieu (Szewzyk et al. 2000). Par ailleurs, les activités de coopération ont principalement été démontrées pour les processus de dégradation de molécules antagonistes et l'échange de métabolites (Møller et al. 1998, Szewzyk et al. 2000, Simões et al. 2007). Une corrélation positive entre les pathogènes et les ASV supposerait alors une relation bénéfique et coopérative entre ces derniers alors qu'une corrélation négative impliquerait une relation plutôt compétitive. L'absence de coopération ne doit pas être négligée puisque des traits écophysiologiques convergents ou complémentaires pourraient faire en sorte que deux espèces occupent les mêmes niches écologiques sans pour autant entretenir des interactions. Les données émanant de cette étude suggèrent donc une forte relation compétitive entre *S. maltophilia* et les bactéries de la famille des *Sphingomonadaceae* et du genre *Schlegelella*. Des relations coopératives où des traits écophysiologiques compatibles peuvent notamment être supposés avec les genres bactériens *Elizabethkingia*, *Delftia* et *Methylobacterium-Methylorubrum*. Des observations similaires sont constatées avec *S. marcescens* mais l'intensité de ces relations est moins importante par rapport à *S. maltophilia*.

De plus, les genres *Elizabethkingia*, *Delftia* et *Methylobacterium-Methylorubrum* ont été identifiés dans cette étude comme étant spécifiques à l'environnement du drain, plus particulièrement au biofilm pour *Elizabethkingia* et *Methylobacterium-Methylorubrum* et à l'eau pour *Delftia* alors que les genres *Sphingomonas* et *Schlegelella* ont principalement été retrouvés dans l'eau du robinet. Comme expliqué précédemment, l'occurrence des pathogènes était plus importante dans les échantillons de drains plutôt que dans l'eau du robinet. Il est donc intéressant de spécifier qu'une relation positive a pu être observé entre les trois genres spécifiques au drain et les PO alors que les genres spécifiques à l'eau du robinet ont présenté une relation négative avec ces pathogènes. Cela pourrait alors être un des facteurs expliquant le fait que les pathogènes étaient retrouvés dans une moindre proportion dans l'eau du robinet. Un facteur supplémentaire qui serait intéressant à prendre en compte est que dans cette étude, les communautés étaient très stables dans l'eau du robinet laissant suggérer que ces dernières étaient bien établies dans ce milieu ; il serait donc possible que les PO aient plus de mal à se développer de par

le principe d'exclusion de la niche écologique. L'ensemble de ces observations justifie l'importance de poursuivre l'analyse de l'écologie microbienne des environnements éviers afin de développer des mesures innovantes et efficaces de contrôle de qualité d'eau (Simões et al. 2007)

Finalement, 8 % de la variation des communautés microbiennes étaient expliqués par les paramètres physico-chimiques et le profil de distribution des pathogènes dans les échantillons de drains. Ceci indique une redondance entre la physico-chimie et les PO. Étant donné que cette dernière est inférieure à la somme des deux parties, il demeure important de conserver ces variables dans de futures études.

Compte tenu du fait qu'une corrélation est insuffisante pour assurer un lien de causalité pour expliquer la covariation de deux variables, il serait primordial d'étudier plus en détails la relation entre les ASV identifiés et les pathogènes sous diverses conditions. En effet, l'interaction des pathogènes avec les bactéries en suspension dans l'eau peut favoriser ou non l'insertion de ces pathogènes dans un biofilm (Dai et al. 2017). De précédentes études menées par Dai et al. ont appuyé le fait que l'interaction des pathogènes avec des bactéries en suspension pouvait être différente qu'avec ces mêmes bactéries en biofilm (Dai et al. 2017). En effet, il s'est avéré que *S. maltophilia* en suspension favorisait l'insertion de *E. coli* dans un biofilm alors qu'elle inhibait cette insertion quand elle était en biofilm (Dai et al. 2017). Cela révèle alors d'interactions synergiques qui auront tendance à favoriser la colonisation des biofilms par des pathogènes ou d'interactions antagoniques qui empêcheront leur colonisation (Dai et al. 2017). Il serait important de réaliser les expériences évaluant les interactions entre les ASV d'intérêts et les PO dans des conditions physico-chimiques variables afin d'évaluer comment les conditions abiotiques du milieu façonnent la relation entre les communautés microbiennes et la distribution des PO. Ceci est d'autant plus important puisque la survie des agents pathogènes dans l'eau est basée sur des interactions avec de nombreux facteurs tels que la physico-chimie et la communauté microbienne (Berry et al. 2006). En assumant que la relation entre la survie des pathogènes, la structure des communautés microbiennes et la physico-chimie soit validée en conditions expérimentales contrôlées, ces expériences supplémentaires permettraient de formuler des conclusions tangibles pouvant mener à la création de modèles prédictifs d'invasion de pathogènes dans les éviers. De tels modèles seraient souhaitables pour réduire le taux d'infections nosocomiales dans les hôpitaux en ciblant les efforts de prévention aux endroits les plus propices à une prolifération des PO. L'idée serait de pouvoir ressortir un ou plusieurs ASV ayant un réel impact sur le maintien de pathogènes dans les réseaux d'eau. Des études similaires ont été effectuées pour prédire les efflorescences de cyanobactéries dans les eaux douces (Tromas et al. 2017). En effet, il s'est avéré que ces dernières étaient corrélées à de nombreux facteurs environnementaux abiotiques tels que la température, l'azote ou encore les changements saisonniers. Mais de façon plus marquée, il a été démontré que certaines communautés microbiennes étaient fortement spécifiques aux efflorescences des cyanobactéries et ceci a pu être remarqué dans le temps. Par ailleurs, il a notamment pu être observé que les communautés commençaient à changer avant une floraison complète. Ainsi, un modèle prédictif constitué des facteurs environnementaux abiotiques

et des données de séquences spécifiques aux événements d'effervescence a pu être constitué permettant de prévenir une éclosion de cyanobactéries dans les lacs. Un modèle similaire pourrait être appliqué à cette étude. Pour cela il faudrait réaliser un échantillonnage sur le long terme pour s'assurer que les communautés changent semblablement avant une éclosion. De plus, il serait intéressant d'inclure d'autres facteurs dans ce modèle tels que la prédisposition des patients à contracter une infection nosocomiale, les pratiques invasives que peuvent subir les patients ou encore les mains du personnel soignant pouvant être un véritable vecteur de pathogènes.

6 CONCLUSION

Ce projet de maîtrise a permis de mettre en lumière l'impact potentiel de la physico-chimie et de la niche écologique sur le maintien des pathogènes dans l'environnement évier de l'USIN d'un hôpital de la région de Montréal. L'ensemble des campagnes d'échantillonnage ont permis d'identifier le drain comme étant la composante principale de l'environnement évier abritant les PO d'intérêts de cette étude. Par ailleurs, une diversité beaucoup plus variable a été observée dans les échantillons de drain que dans les échantillons d'eau du robinet suggérant une importante adaptabilité des espèces présentes dans l'eau du robinet. De plus, il s'est avéré que la physico-chimie de l'eau jouait un rôle non négligeable sur la composition bactérienne des échantillons. Ainsi, un impact significatif de la physico-chimie et de la communauté bactérienne sur la distribution des PO dans l'eau a été mis en évidence. Cependant, il n'est encore pas possible de conclure quant aux véritables interactions de ces paramètres avec les PO influençant leur développement dans un milieu. Des expériences supplémentaires en conditions contrôlées seraient nécessaires pour étudier spécifiquement les interactions entre les PO et les ASV identifiés dans cette étude. En suivant cette approche, les mêmes expériences devraient être réalisées en faisant varier les paramètres physico-chimiques. Cela pourrait alors permettre d'établir un modèle prédictif d'acquisition de PO dans l'environnement évier.

**ANNEXE I VOLUME DES CONSTITUANTS DU MASTER MIX
DE LA PCR 16S**

	x 1 échantillon (µL)
H ₂ O Milli-Q	19
Amorce F (10 µM)	0,5
Amorce R (10 µM)	0,5
MgSO ₄ (25 mM)	0,25
BSA (20 µg/mL)	0,25
Tampon II (10 X)	2,5
Taq Haute-fidélité	0,1

ANNEXE II PARAMETRES DE LA REACTION DE PCR 16S

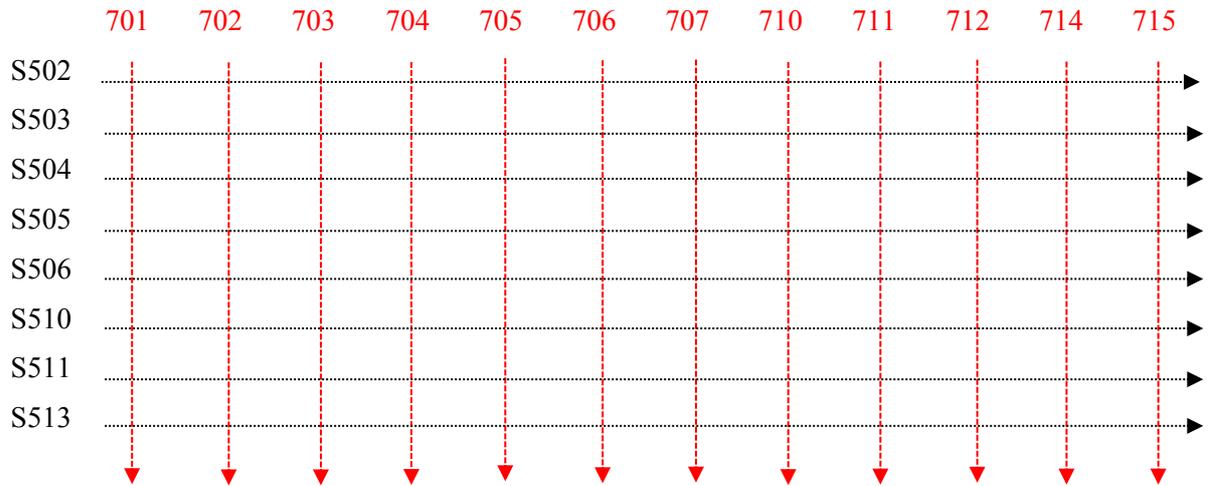
Température	Durée
94 °C	5 min
94 °C	30 s
55 °C	30 s
68 °C	30 s
68 °C	10 min
4 °C	∞

} x 8 cycles

ANNEXE III VOLUME DES CONSTITUANTS DE LA PCR INDEX

	x 1 échantillon (µL)
H ₂ O Milli-Q	12,9
MgSO ₄ (25 mM)	0,25
BSA (20 µg/mL)	0,25
Tampon II (10 X)	2,5
Taq Haute Fidélité	0,1

ANNEXE IV PLAN DE REPARTITION DES AMORCES INDEX SUR UNE PLAQUE 96 Puits



ANNEXE V**PARAMETRES DE LA REACTION DE PCR
INDEX**

Température	Durée
94 °C	3 min
94 °C	30 s
55 °C	30 s
68 °C	30 s
68 °C	5 min
4 °C	∞

X 8 cycles

BIBLIOGRAPHIE

- Abbassi, M. S., A. Touati, W. Achour, A. Cherif, S. Jabnoun, N. Khrouf and A. Ben Hassen (2009). "*Stenotrophomonas maltophilia* responsible for respiratory infections in neonatal intensive care unit: antibiotic susceptibility and molecular typing." Pathol Biol (Paris) **57**(5): 363-367.
- Abdi, H. and L. J. Williams (2010). "Principal component analysis." WIREs Computational Statistics **2**(4): 433-459.
- Adjidé, C., A. De Meyer, M. Weyer, O. Obin, F. Lamory, C. Lesueur, L. Trouillet, M. Biendo, O. Ganry and F. Eb (2009). "A sensitive, specific and predictive isolation medium developed for *Stenotrophomonas maltophilia* study in healthcare settings." Pathologie-biologie **58**(1): 11-17.
- AL-Gheethi, A. A., N. Ismail, J. Lalung, A. Talib and M. O. A. Kadir (2013). "Reduction of Faecal Indicators and Elimination of Pathogens from Sewage Treated Effluents by Heat Treatment." Caspian Journal of Applied Sciences Research **2**(2).
- Al-Jabri, R. M., A. M. Al-Hejin, R. Gashgari, N. M. Bataweel, M. Abu-Zaid, M. M. Mahmoud, A. A. Najjar and M. M. M. Ahmed (2019). "Screening and Prevention of Nosocomial Infections in Neonatal Intensive Care Unit (NICU)." Advances in Environmental Biology **13**(1): 14-23.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation and Water Environment Federation (1912). Standard methods for the examination of water and wastewater, American Public Health Association.
- Anderson, M. J. (2014). "Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA)." Wiley statsref: statistics reference online: 1-15.
- Awoke, N., T. Kassa and L. Teshager (2019). "Magnitude of Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance Pattern of Bacteria Isolated from Urinary Catheterized Inpatients of Jimma University Medical Center, Southwest Ethiopia." International Journal of Microbiology **2019**: 5729568.
- Aziz, K., D. D. McMillan, W. Andrews, M. Pendray, Z. Qiu, S. Karuri and S. K. Lee (2005). "Variations in rates of nosocomial infection among Canadian neonatal intensive care units may be practice-related." BMC pediatrics **5**(1): 1-12.
- Bédard, E., C. Laferrière, D. Charron, C. Lalancette, C. Renaud, N. Desmarais, E. Déziel and M. Prévost (2015). "Post-Outbreak Investigation of *Pseudomonas aeruginosa* Faucet Contamination by Quantitative Polymerase Chain Reaction and Environmental Factors Affecting Positivity." Infection Control & Hospital Epidemiology **36**(11): 1337-1343.
- Bédard, E., C. Laferrière, E. Déziel and M. Prévost (2018). "Impact of stagnation and sampling volume on water microbial quality monitoring in large buildings." PLoS One **13**(6): e0199429.
- Benedict, K. M., H. Reses, M. Vigar, D. M. Roth, V. A. Roberts, M. Mattioli, L. A. Cooley, E. D. Hilborn, T. J. Wade, K. E. Fullerton, J. S. Yoder and V. R. Hill (2017). "Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water - United States, 2013-2014." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **66**(44): 1216-1221.
- Benoit, M.-È., M. Prévost, A. Succar, D. Charron, E. Déziel, E. Robert and E. Bédard (2021). "Faucet aerator design influences aerosol size distribution and microbial contamination level." Science of the Total Environment **775**: 145690.
- Berger, P., M. LeChevallier and D. Reasoner (1992). "Control of biofilm growth in drinking water distribution systems." US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Berry, D., C. Xi and L. Raskin (2006). "Microbial ecology of drinking water distribution systems." Current opinion in biotechnology **17**(3): 297-302.
- Borriello, G., E. Werner, F. Roe, A. M. Kim, G. D. Ehrlich and P. S. Stewart (2004). "Oxygen Limitation Contributes to Antibiotic Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **48**(7): 2659-2664.

- Bourdin, T., A. Monnier, M.-È. Benoit, E. Bédard, M. Prévost, C. Quach, E. Déziel, P. Constant and C. A. Elkins (2021). "A High-Throughput Short Sequence Typing Scheme for *Serratia marcescens* Pure Culture and Environmental DNA." Applied and Environmental Microbiology **87**(24): e01399-01321.
- Brooke, J. S. (2012). "*Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen." Clinical Microbiology Reviews **25**(1): 2-41.
- Brown, V. I. and E. J. L. Lowbury (1965). "Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*." Journal of Clinical Pathology **18**(6): 752.
- Callahan, B. J., P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson and S. P. Holmes (2016). "DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data." Nature Methods **13**(7): 581-583.
- Dai, D., L. Raskin and C. Xi (2017). "The effect of interactions between a bacterial strain isolated from drinking water and a pathogen surrogate on biofilms formation diverged under static vs flow conditions." Journal of Applied Microbiology **123**(6): 1614-1627.
- de Abreu, P. M., P. G. Farias, G. S. Paiva, A. M. Almeida and P. V. Morais (2014). "Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard." BMC microbiology **14**(1): 1-10.
- de Bentzmann, S. and P. Plésiat (2011). "The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections." Environmental Microbiology **13**(7): 1655-1665.
- Decker, B. K. and T. N. Palmore (2014). "Hospital water and opportunities for infection prevention." Current infectious disease reports **16**(10): 432.
- Dias, V. C., A.-A. Durand, P. Constant, M. Prévost and E. Bédard (2019). "Identification of factors affecting bacterial abundance and community structures in a full-scale chlorinated drinking water distribution system." Water **11**(3): 627.
- Dias, V. C. F., A.-A. Durand, P. Constant, M. Prévost and E. Bédard (2019). "Identification of Factors Affecting Bacterial Abundance and Community Structures in a Full-Scale Chlorinated Drinking Water Distribution System." Water **11**(3): 627.
- Dinno, A. (2015). "Nonparametric Pairwise Multiple Comparisons in Independent Groups using Dunn's Test." The Stata Journal **15**(1): 292-300.
- Dixon, P. (2003). "VEGAN, a package of R functions for community ecology." Journal of Vegetation Science **14**(6): 927-930.
- Dzieciol, M., E. Schornsteiner, M. Muhterem-Uyar, B. Stessl, M. Wagner and S. Schmitz-Esser (2016). "Bacterial diversity of floor drain biofilms and drain waters in a *Listeria monocytogenes* contaminated food processing environment." International Journal of Food Microbiology **223**: 33-40.
- Edberg, S., E. Rice, R. Karlin and M. Allen (2000). "Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection." Journal of applied microbiology **88**(S1): 106S-116S.
- El-Liethy, M. A., B. A. Hemdan and G. E. El-Taweel (2020). "Prevalence of *E. coli*, *Salmonella*, and *Listeria* spp. as potential pathogens: A comparative study for biofilm of sink drain environment." Journal of Food Safety **40**(4): e12816.
- Falagas, M. E., A. C. Kastoris, E. K. Vouloumanou and G. Dimopoulos (2009). "Community-acquired *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **28**(7): 719-730.
- Forstinus, N. O., N. E. Ikechukwu, M. P. Emenike and A. O. Christiana (2015). "Water and waterborne diseases: A review." International Journal of Tropical disease & health: 1-14.
- Gilbert, Y., M. Veillette and C. Duchaine (2010). "Airborne bacteria and antibiotic resistance genes in hospital rooms." Aerobiologia **26**(3): 185-194.

- Giles, M., H. Harwood, D. Gosling, D. Hennessy, C. Pearce and A. J. Daley (2006). "What is the best screening method to detect *Serratia marcescens* colonization during an outbreak in a neonatal intensive care nursery" Journal of Hospital Infection **62**(3): 349-352.
- Goldmann, D. A. (1989). "Prevention and management of neonatal infections." Infectious disease clinics of North America **3**(4): 779-814.
- Gröschel, M. I., C. J. Meehan, I. Barilar, M. Diricks, A. Gonzaga, M. Steglich, O. Conchillo-Solé, I. C. Scherer, U. Mamat, C. F. Luz, K. De Bruyne, C. Utpatel, D. Yero, I. Gibert, X. Daura, S. Kampmeier, N. A. Rahman, M. Kresken, T. S. van der Werf, I. Alio, W. R. Streit, K. Zhou, T. Schwartz, J. W. A. Rossen, M. R. Farhat, U. E. Schaible, U. Nübel, J. Rupp, J. Steinmann, S. Niemann and T. A. Kohl (2020). "The phylogenetic landscape and nosocomial spread of the multidrug-resistant opportunist *Stenotrophomonas maltophilia*." Nat Commun **11**(1): 2044.
- Haley, R. W., D. H. Culver, J. W. White, W. M. Morgan, T. G. Emori, v. P. Munn and T. M. Hooton (1985). "The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in us hospitals." American journal of epidemiology **121**(2): 182-205.
- Hallam, N. B., J. R. West, C. F. Forster and J. Simms (2001). "The potential for biofilm growth in water distribution systems." Water Res **35**(17): 4063-4071.
- Henne, K., L. Kahlisch, I. Brettar and M. G. Höfle (2012). "Analysis of structure and composition of bacterial core communities in mature drinking water biofilms and bulk water of a citywide network in Germany." Applied and environmental microbiology **78**(10): 3530-3538.
- Hewitt, K. M., F. L. Mannino, A. Gonzalez, J. H. Chase, J. G. Caporaso, R. Knight and S. T. Kelley (2013). "Bacterial diversity in two neonatal intensive care units (NICUs)." PloS one **8**(1): e54703.
- Hsieh, T. C., K. H. Ma and A. Chao (2016). "iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers)." Methods in Ecology and Evolution **7**(12): 1451-1456.
- Hunter, P. (1997). Waterborne disease: epidemiology and ecology, John Wiley & Sons.
- Inkinen, J., B. Jayaprakash, J. W. Santo Domingo, M. M. Keinänen-Toivola, H. Ryu and T. Pitkänen (2016). "Diversity of ribosomal 16S DNA- and RNA-based bacterial community in an office building drinking water system." Journal of Applied Microbiology **120**(6): 1723-1738.
- Institut national de santé publique du Québec (2021). "Les infections nosocomiales."
- Inweregbu, K., J. Dave and A. Pittard (2005). "Nosocomial infections." Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain **5**(1): 14-17.
- Kataoka, D., H. Fujiwara, T. Kawakami, Y. Tanaka, A. Tanimoto, S. Ikawa and Y. Tanaka (2003). "The indirect pathogenicity of *Stenotrophomonas maltophilia*." International Journal of Antimicrobial Agents **22**(6): 601-606.
- Kataoka, D. and Y. Tanaka (2003). "The clinical aspects of beta-lactam-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*." Yonago Acta medica **46**(4): 91-102.
- Kaul, A., S. Mandal, O. Davidov and S. D. Peddada (2017). "Analysis of Microbiome Data in the Presence of Excess Zeros." Frontiers in Microbiology **8**(2114).
- Khan, H. A., A. Ahmad and R. Mehboob (2015). "Nosocomial infections and their control strategies." Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine **5**(7): 509-514.
- Khan, H. A., F. K. Baig and R. Mehboob (2017). "Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance." Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine **7**(5): 478-482.
- Kurz, C. L., S. Chauvet, E. Andrès, M. Aurouze, I. Vallet, G. P. F. Michel, M. Uh, J. Celli, A. Filloux, S. de Bentzmann, I. Steinmetz, J. A. Hoffmann, B. B. Finlay, J.-P. Gorvel, D. Ferrandon and J. J. Ewbank (2003). "Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening." The EMBO Journal **22**(7): 1451-1460.

- Lalancette, C., D. Charron, C. Laferrière, P. Dolcé, E. Déziel, M. Prévost and E. Bédard (2017). "Hospital drains as reservoirs of *Pseudomonas aeruginosa*: multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis genotypes recovered from faucets, sink surfaces and patients." Pathogens **6**(3): 36.
- Lam, B. C., J. Lee and Y. Lau (2004). "Hand hygiene practices in a neonatal intensive care unit: a multimodal intervention and impact on nosocomial infection." Pediatrics **114**(5): e565-e571.
- Legendre, P. and M. J. Anderson (1999). "Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments." Ecological monographs **69**(1): 1-24.
- Legendre, P. and E. D. Gallagher (2001). "Ecologically meaningful transformations for ordination of species data." Oecologia **129**(2): 271-280.
- Léziart, T., P.-M. Dutheil de la Rochere, R. Cheswick, P. Jarvis and A. Nocker (2019). "Effect of turbidity on water disinfection by chlorination with the emphasis on humic acids and chalk." Environmental technology **40**(13): 1734-1743.
- Lu, P., C. Chen, Q. Wang, Z. Wang, X. Zhang and S. Xie (2013). "Phylogenetic diversity of microbial communities in real drinking water distribution systems." Biotechnology and Bioprocess Engineering **18**(1): 119-124.
- Mahlen, S. D. (2011). "*Serratia* infections: from military experiments to current practice." Clin Microbiol Rev **24**(4): 755-791.
- Maragakis, L. L., A. Winkler, M. G. Tucker, S. E. Cosgrove, T. Ross, E. Lawson, K. C. Carroll and T. M. Perl (2008). "Outbreak of multidrug-resistant *Serratia marcescens* infection in a neonatal intensive care unit." Infection Control & Hospital Epidemiology **29**(5): 418-423.
- Martin, M. (2011). "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads." EMBnet. journal **17**(1): 10-12.
- McBain, A. J., R. G. Bartolo, C. E. Catrenich, D. Charbonneau, R. G. Ledder, A. H. Rickard, S. A. Symmons and P. Gilbert (2003). "Microbial characterization of biofilms in domestic drains and the establishment of stable biofilm microcosms." Applied and environmental microbiology **69**(1): 177-185.
- McCoy, S. T. and J. M. VanBriesen (2012). "Temporal variability of bacterial diversity in a chlorinated drinking water distribution system." Journal of Environmental Engineering **138**(7): 786-795.
- Meletis, G., M. Exindari, N. Vavatsi, D. Sofianou and E. Diza (2012). "Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." Hippokratia **16**(4): 303.
- Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (2021). Guide d'interprétation du Règlement sur la qualité de l'eau potable. Bibliothèque et Archives nationales du Québec, Gouvernement du Québec: 18-25.
- Ministère de la santé et des services sociaux du Québec (2018). "Infections nosocomiales."
- Møller, S., C. Sternberg, J. B. Andersen, B. B. Christensen, J. L. Ramos, M. Givskov and S. Molin (1998). "In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members." Applied and environmental microbiology **64**(2): 721-732.
- Murray, P. R., K. S. Rosenthal and M. A. Pfaller (2020). Medical microbiology E-book, Elsevier Health Sciences.
- Muyldermans, A., F. Crombé, P. Bosmans, F. Cools, D. Piérard and I. Wybo (2021). "*Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit and the potential of whole-genome sequencing." Journal of Hospital Infection **111**: 148-154.
- Nagata, E., A. S. Brito and T. Matsuo (2002). "Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit: incidence and risk factors." American journal of infection control **30**(1): 26-31.
- OmegaBioservices 16S Reference.
- Pachori, P., R. Goyal and P. Gandhi (2019). "Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review." Genes Dis **6**(2): 109-119.

- Paopradit, P., K. Sritiwarawong, N. Ingviya, K. Singkhamanan and V. Vuddhakul (2017). "Distribution and characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from environmental and clinical samples in Thailand." Journal of Hospital Infection **97**(2): 185-191.
- Poitelon, J.-B., M. Joyeux, B. Welté, J.-P. Duguet, E. Prestel, O. Lespinet and M. S. DuBow (2009). "Assessment of phylogenetic diversity of bacterial microflora in drinking water using serial analysis of ribosomal sequence tags." Water research **43**(17): 4197-4206.
- Prévost, M., M. Besner, P. Laurent and P. Servais (2013). Emerging issues of biological stability in drinking water distribution systems, IWA publishing.
- Prüss, A., D. Kay, L. Fewtrell and J. Bartram (2002). "Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level." Environmental health perspectives **110**(5): 537-542.
- Rangelova, V., A. Kevorkyan and M. Krasteva (2020). "Nosocomial infections in the neonatal intensive care unit."
- Revetta, R. P., R. S. Matlib and J. W. Santo Domingo (2011). "16S rRNA Gene Sequence Analysis of Drinking Water Using RNA and DNA Extracts as Targets for Clone Library Development." Current Microbiology **63**(1): 50-59.
- Revetta, R. P., A. Pemberton, R. Lamendella, B. Iker and J. W. Santo Domingo (2010). "Identification of bacterial populations in drinking water using 16S rRNA-based sequence analyses." Water Research **44**(5): 1353-1360.
- Rice, E., R. Baird, A. Eaton and L. Clesceri (2012). "APHA (American Public Health Association): Standard method for the examination of water and wastewater." Washington DC (US): AWWA (American Water Works Association) and WEF (Water Environment Federation).
- Roeselers, G., J. Coolen, P. W. van der Wielen, M. C. Jaspers, A. Atsma, B. de Graaf and F. Schuren (2015). "Microbial biogeography of drinking water: patterns in phylogenetic diversity across space and time." Environmental microbiology **17**(7): 2505-2514.
- Rogers, J., A. Dowsett, P. Dennis, J. Lee and C. Keevil (1994). "Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora." Applied and Environmental Microbiology **60**(5): 1585-1592.
- Róžańska, A., J. Wójkowska-Mach, P. Adamski, M. Borszewska-Kornacka, E. Gulczyńska, M. Nowiczewski, E. Helwich, A. Kordek, D. Pawlik and M. Bulanda (2015). "Infections and risk-adjusted length of stay and hospital mortality in Polish Neonatology Intensive Care Units." International Journal of Infectious Diseases **35**: 87-92.
- Sandner-Miranda, L., P. Vinuesa, A. Cravioto and R. Morales-Espinosa (2018). "The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*." Frontiers in microbiology **9**: 828.
- Satnwell-Smith, R. (2010). "Classification of waterrelated diseases in water and health." Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS) **1**.
- Semenza, J. C., S. Herbst, A. Rechenburg, J. E. Suk, C. Höser, C. Schreiber and T. Kistemann (2012). "Climate change impact assessment of food- and waterborne diseases." Critical reviews in environmental science and technology **42**(8): 857-890.
- Shaw, J. L., P. Monis, L. S. Weyrich, E. Sawade, M. Drikas and A. J. Cooper (2015). "Using amplicon sequencing to characterize and monitor bacterial diversity in drinking water distribution systems." Applied and environmental microbiology **81**(18): 6463-6473.
- Simões, L. C., M. Simões and M. J. Vieira (2007). "Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water." Applied and environmental microbiology **73**(19): 6192-6200.
- Şimşek, M. (2019). "Determination of the antibiotic resistance rates of *Serratia marcescens* isolates obtained from various clinical specimens." Nigerian journal of clinical practice **22**(1).

- Smelt, J. and S. Brul (2014). "Thermal inactivation of microorganisms." Critical reviews in food science and nutrition **54**(10): 1371-1385.
- Smiech, K., T. Kovács, R. Wildschut, A. C. Monleon, B. de Vries-Onclin, J. Bowen and L. Agostinho (2020). "Thermal disinfection of hospital wastewater in a pilot-scale continuous-flow system." Applied Water Science **10**(4): NA-NA.
- Sokolova, E., T. J. Pettersson, O. Bergstedt and M. Hermansson (2013). "Hydrodynamic modelling of the microbial water quality in a drinking water source as input for risk reduction management." Journal of hydrology **497**: 15-23.
- Starr, M. P., P. Grimont, F. Grimont and P. Starr (1976). "Caprylate-thallos agar medium for selectively isolating *Serratia* and its utility in the clinical laboratory." Journal of Clinical Microbiology **4**(3): 270-276.
- Stewart, P. S. and J. W. Costerton (2001). "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms." Lancet **358**(9276): 135-138.
- Szewzyk, U., R. Szewzyk, W. Manz and K.-H. Schleifer (2000). "Microbiological Safety of Drinking Water." Annual Review of Microbiology **54**(1): 81-127.
- Tang, W., Y. Mao, Q. Y. Li, D. Meng, L. Chen, H. Wang, R. Zhu and W. X. Zhang (2020). "Prevalence of Opportunistic Pathogens and Diversity of Microbial Communities in the Water System of a Pulmonary Hospital." Biomedical and Environmental Sciences **33**(4): 248-259.
- Thornton, G., R. Prentice and M. Watson (2006). The safe reuse of water using heat disinfection. Conference paper Enviro.
- Torvinen, E., M. J. Lehtola, P. J. Martikainen and I. T. Miettinen (2007). "Survival of *Mycobacterium avium* in drinking water biofilms as affected by water flow velocity, availability of phosphorus, and temperature." Applied and Environmental Microbiology **73**(19): 6201-6207.
- Tromas, N., N. Fortin, L. Bedrani, Y. Terrat, P. Cardoso, D. Bird, C. W. Greer and B. J. Shapiro (2017). "Characterising and predicting cyanobacterial blooms in an 8-year amplicon sequencing time course." The ISME Journal **11**(8): 1746-1763.
- USEPA, U. (2015). EPA Guidance Manual—Alternative Disinfectants and Oxidants.
- Van der Zwet, W., A. Kaiser, R. Van Elburg, J. Berkhof, W. Fetter, G. Parlevliet and C. Vandenbroucke-Grauls (2005). "Nosocomial infections in a Dutch neonatal intensive care unit: surveillance study with definitions for infection specifically adapted for neonates." Journal of hospital infection **61**(4): 300-311.
- Vaz-Moreira, I., O. C. Nunes and C. M. Manaia (2014). "Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome." FEMS microbiology reviews **38**(4): 761-778.
- Vaz-Moreira, I., O. C. Nunes and C. M. Manaia (2017). "Ubiquitous and persistent Proteobacteria and other Gram-negative bacteria in drinking water." Science of The Total Environment **586**: 1141-1149.
- Verweij, P. E., J. F. Meis, V. Christmann, M. Van der Bor, W. J. Melchers, B. G. Hilderink and A. Voss (1998). "Nosocomial outbreak of colonization and infection with *Stenotrophomonas maltophilia* in preterm infants associated with contaminated tap water." Epidemiol Infect **120**(3): 251-256.
- Wei, T., V. Simko, M. Levy, Y. Xie, Y. Jin and J. Zemla (2017). "Package 'corrplot'." Statistician **56**(316): e24.
- Williams, M., J. Domingo, M. Meckes, C. Kelty and H. Rochon (2004). "Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator." Journal of Applied Microbiology **96**(5): 954-964.
- World Health Organization (2006). Clean hands leading to safer health care for half the world's population. Clean hands leading to safer health care for half the world's population.

World Health Organization (2011). "Guidelines for drinking-water quality." World Health Organization **216**: 303-304.

World Health Organization (2019). "Fact sheet on drinking water." World Health Organization, Geneva. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>. Accessed **13**.

Xi, C., Y. Zhang, C. F. Marrs, W. Ye, C. Simon, B. Foxman and J. Nriagu (2009). "Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems." Applied and environmental microbiology **75**(17): 5714-5718.

Yin, C., W. Yang, J. Meng, Y. Lv, J. Wang and B. Huang (2017). "Co-infection of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* in hospitalised pneumonia patients has a synergic and significant impact on clinical outcomes." European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **36**(11): 2231-2235.

Yu, Z. and W. W. Mohn (1999). "Killing two birds with one stone: simultaneous extraction of DNA and RNA from activated sludge biomass." Canadian journal of microbiology **45**(3): 269-272.

Zhang, J., W. Li, J. Chen, W. Qi, F. Wang and Y. Zhou (2018). "Impact of biofilm formation and detachment on the transmission of bacterial antibiotic resistance in drinking water distribution systems." Chemosphere **203**: 368-380.

Zhou, W., W. Li, J. Chen, Y. Zhou, Z. Wei and L. Gong (2021). "Microbial diversity in full-scale water supply systems through sequencing technology: a review." RSC Advances **11**(41): 25484-25496.

Zlatanović, L., J. P. van der Hoek and J. Vreeburg (2017). "An experimental study on the influence of water stagnation and temperature change on water quality in a full-scale domestic drinking water system." Water research **123**: 761-772.
