

# Microbiologie et déchets : évaluation des risques sanitaires





**ETUDE N° 09-0669/1A**

**MICROBIOLOGIE ET DECHETS :  
EVALUATION DES RISQUES SANITAIRES**

**RAPPORT FINAL**

**juin 2011**

**P. DE GIUDICI, M.-T. GUILLAM, C. SEGALA**  
- SEPIA-Santé



Créée en 1989 à l'initiative du Ministère en charge de l'Environnement, l'association RECORD – REseau COopératif de Recherche sur les Déchets et l'Environnement – est le fruit d'une triple coopération entre industriels, pouvoirs publics et chercheurs. L'objectif principal de RECORD est le financement et la réalisation d'études et de recherches dans le domaine des déchets et des pollutions industrielles.

Les membres de ce réseau (groupes industriels et organismes publics) définissent collégalement des programmes d'études et de recherche adaptés à leurs besoins. Ces programmes sont ensuite confiés à des laboratoires publics ou privés.

**Avertissement :**

Les rapports ont été établis au vu des données scientifiques et techniques et d'un cadre réglementaire et normatif en vigueur à la date de l'édition des documents.

Ces documents comprennent des propositions ou des recommandations qui n'engagent que leurs auteurs. Sauf mention contraire, ils n'ont pas vocation à représenter l'avis des membres de RECORD.

- ✓ Pour toute reprise d'informations contenues dans ce document, l'utilisateur aura l'obligation de citer le rapport sous la référence :  
**RECORD**, Microbiologie et déchets : évaluation des risques sanitaires, 2011, 100 p, n°09-0669/1A
  
- ✓ Ces travaux ont reçu le soutien de l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie)  
[www.ademe.fr](http://www.ademe.fr)

© RECORD, 2011

## **GLOSSAIRE**

### **Institutions :**

AESA : Agence Européenne de Sécurité Alimentaire  
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaires des Aliments  
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire  
ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry  
CDC : Center for Disease Control  
CSHPPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France  
FAO : Food and Agriculture Organization  
HSBD : Hazardous Substances Database  
HSE : Health and Safety Executive  
ILSI : International Life Science Institute  
INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des Risques  
INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles.  
INVS : Institut National de Veille Sanitaire  
MSA : Mutualité Sociale Agricole  
NRC : National Research Council  
OIE : Office International des Epizooties  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
WHO : World Health Organization

### **Termes techniques :**

ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ARN : Acide RiboNucléique  
DAOA : Denrées Alimentaires d'Origine Animale  
DASRI : Déchets d'Activités de Soins à Risque Infectieux  
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
EQRM : Evaluation Quantitative de Risque Microbiologique  
EQRS : Evaluation Quantitative du Risque Sanitaire  
ERM : Evaluation de Risque Microbiologique  
ERS : Evaluation des risques sanitaires  
ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine  
ICPE : Installations Classées pour la Protection de l'Environnement  
LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level  
LPS : Lipopolysaccharides  
MPN-PCR : Most Probable Number PCR  
NOAEL : No Observed Adverse Effect Level  
NPP : Nombre le Plus Probable  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR  
RTQ-PCR : Real-Time quantitative PCR

SIDA : Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis

TIAC : Toxi-Infections Alimentaires Collectives

UFC : Unité Formant Colonie

UFP : Unité Formant Plaque

VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humaine

VTR : Valeur Toxicologique de Référence

## **RESUME**

Dans le cadre des approches d'Évaluations des Risques Sanitaires, les Évaluations des Risques Microbiologiques (ERM) sont les plus difficiles à réaliser. Un travail de recherches et d'analyses bibliographiques a été mené afin d'actualiser les connaissances sur ce thème.

Les méthodes d'ERM ont été calquées sur le modèle de l'évaluation du risque chimique (succession des 4 étapes). Selon les connaissances disponibles, l'objectif et le mode d'expression des résultats recherchés, trois types d'ERM peuvent être mis en œuvre : qualitative (la plus fréquente), semi-quantitative et quantitative (EQRM). Cette dernière est fortement basée sur l'approche menée en risque chimique. Cependant, l'ERM présente des spécificités liées aux pathogènes infectieux (bactéries, virus, protozoaires, champignons, helminthes et prions) qui rendent difficile l'application de la démarche chimique.

Les méthodes d'identification et de quantification des germes ont connu des avancées significatives ces dernières années avec notamment le développement des techniques d'amplifications géniques.

Concernant les transferts et la survie des germes dans les différents milieux, les transferts aériens ont été relativement bien étudiés et ont fait l'objet de modélisations. Les transferts au sein du sol, dans la zone non saturée semblent limités aux organismes de taille réduite (virus). Des données existent sur les transferts de germes vers les végétaux, mais les connaissances sont encore insuffisantes pour les estimer quantitativement.

Si les exemples d'EQRM sont relativement nombreux dans le domaine de la sécurité alimentaire, les EQRM appliqués à la filière déchets concernent essentiellement l'épandage de boues d'épuration et les plateformes de compostage des déchets, principales sources d'exposition des populations générales. Mais lorsque qu'une exposition multimédia est étudiée, par exemple dans le cas d'épandage, les incertitudes apparaissent notamment au niveau des coefficients de transfert entre milieux et de survie dans les différents milieux, fragilisant les résultats quantitatifs obtenus. Les besoins en matière de recherche vis-à-vis de la filière déchets concernent donc, d'une part le renforcement des connaissances permettant de réduire les incertitudes afférentes aux différentes étapes de l'EQRM et d'autre part l'applicabilité au domaine microbiologique des connaissances sur les transferts de milieu et leurs modélisations. Des études épidémiologiques pourraient également s'avérer profitables à proximité des zones d'épandage et des grandes plateformes de compostage ou de stockage des déchets.

## **MOTS CLES**

Risques microbiologiques, évaluation des risques, EQRM, déchets, boues.

-----

## **SUMMARY**

In the field of health risk assessment, Quantitative Microbiological Risks Assessments (QMRA) are the most difficult to carry out. A bibliographic work was made in order to update existing knowledge on this topic.

The methods of Microbiological Risks Assessments (MRA) were copied on the model of the chemical risk assessment (succession of the 4 stages). According to the available knowledge, the objective and the mode of expression of expected results, three types of MRA can be implemented: qualitative (most frequent), semi-quantitative and quantitative. The latter is strongly based on the approach carried out in chemical risk.

However, the MRA has some specificities related to pathogenic agents (bacteria, viruses, protozoa, mushrooms, helminths and prions), that make difficult the use of the chemical approach.

The methods of identification and quantification of the germs knew significant improvements these last years in particular with the development of genic amplifications techniques.

Concerning the transfers and the survival of the germs in the various media, the air transfers were relatively well studied and models were established. The ground transfers, in the unsaturated zone seem limited to the germs of reduced size (virus). Data exist on the transfers of germs towards the plants, but knowledge is still insufficient to estimate them quantitatively.

If the examples of QMRA are comparatively numerous in the field of food safety, the QMRA applied to the waste relates primarily to the spreading of sewage sludge and the installations of waste composting, principal sources of the general populations' exposure. But if a multi-media exposure is considered, for examples in the case of spreading, uncertainties appear in particular for the transfer coefficients between media and survival coefficients in the various media, weakening the quantitative results obtained. The research needs in waste treatment relate on one hand to the reinforcement of knowledge to reduce uncertainties related at the various stages of the QMRA and on the other hand, to the adaptation of knowledge on transfers and their modelling. Epidemiologic studies should be carried out near the zones of spreading and near the large platforms of composting or storage of waste.

## **KEY WORDS**

Microbiological risk, risk assessment, QMRA, waste, sludge

## **SOMMAIRE**

1.	Problématique, objectifs, et organisation du rapport.....	9
1.1.	La demande de Record.....	9
1.2.	Objectifs de l'étude.....	9
1.3.	Organisation du rapport .....	10
2.	Première Partie : L'évaluation de Risque Microbiologique (ERM) .....	11
2.1.	Méthodologie utilisée et résultats obtenus .....	12
2.1.1.	Méthodologie de recherche bibliographique.....	12
2.1.2.	Résultats de la recherche bibliographique .....	13
2.2.	Concepts généraux et différents types d'ERM.....	14
2.2.1.	Objectifs, définitions et domaines d'application.....	14
2.2.2.	Evaluation qualitative de risque microbiologique (ERM qualitative).....	15
2.2.3.	Evaluation semi-quantitative de risque microbiologique (ERM semi-quantitative).....	17
2.2.4.	Evaluation quantitative de risque microbiologique (EQRM) .....	18
2.3.	Caractéristiques et spécificités méthodologiques d'une ERM .....	19
2.3.1.	Formulation du problème .....	19
2.3.2.	Identification du danger .....	20
2.3.2.1.	Caractérisation de l'agent pathogène.....	20
2.3.2.2.	Définition de l'effet sanitaire adverse (effet pathogène) .....	27
2.3.2.3.	Caractérisation de la matrice .....	27
2.3.2.4.	Caractérisation de la population à risque .....	28
2.3.3.	Estimation de l'exposition .....	28
2.3.3.1.	Voies d'exposition à prendre en compte.....	28
2.3.3.2.	Durée d'exposition .....	29
2.3.3.3.	Identification et quantification de l'agent pathogène .....	30
2.3.4.	Construction du Modèle Dose-réponse .....	30
2.3.4.1.	Données de base pour les relations dose-réponse .....	30
2.3.4.2.	Modélisation de la fonction dose-réponse .....	32
2.3.5.	Caractérisation du risque .....	34
2.4.	Transfert et survie des germes dans les différents compartiments environnementaux .....	35
2.4.1.	Transferts des agents infectieux des déchets vers l'air.....	35
2.4.2.	Transfert des agents infectieux vers le sol, les eaux souterraines et superficielles.....	37
2.4.3.	Transfert des agents infectieux à la surface et à l'intérieur des végétaux cultivés .....	38
2.4.4.	Transfert des agents infectieux dans les produits animaux, viande et lait .....	39
2.5.	Apport des nouvelles techniques de détection et de quantification des germes à l'évaluation de risque microbiologique .....	41
2.5.1.	Techniques de prélèvement et d'échantillonnage .....	41
2.5.1.1.	Prélèvement des aérosols .....	41
2.5.1.2.	Prélèvement en milieux solides ou liquides.....	43
2.5.2.	Rappels sur les techniques d'identification et de quantification classiques, récentes et émergentes .....	44
2.5.3.	Techniques de cultures et d'observation .....	44
2.5.3.1.	Techniques immunologiques .....	44
2.5.3.2.	Méthodes d'amplification génique (PCR) .....	45
2.5.3.3.	Puces à ADN .....	47
2.5.3.4.	Biocapteurs.....	48
2.5.3.5.	Récapitulation des apports de chaque famille de techniques.....	50
2.5.4.	Apport des techniques émergentes dans le cadre de l'évaluation du risque microbiologique lié aux déchets : PCR et techniques dérivées .....	51
2.6.	Evaluation de risque microbiologique dans les filières de traitement des déchets.....	53
2.6.1.	Natures et modes d'utilisation/transformation des déchets susceptibles de générer un risque microbiologique .....	53
2.6.2.	Présentation de démarches représentatives d'erm afférentes à la filière déchet .....	55
2.7.	Evaluation de risque microbiologique dans le cas des plateformes de compostage .....	56
2.7.1.	Contexte et fond bibliographique .....	56
2.7.2.	Description de l'activité .....	57
2.7.3.	Identification des dangers.....	58
2.7.3.1.	Agents pathogènes pertinents.....	58

2.7.3.2.	Effets sanitaires observés.....	58
2.7.4.	Estimation des expositions.....	58
2.7.4.1.	Schéma conceptuel et voies d'exposition.....	58
2.7.4.2.	Prélèvement et dénombrement des germes.....	58
2.7.4.3.	Facteur d'émission et modélisation de la dispersion des aérosols.....	59
2.7.4.4.	Niveaux d'exposition mesurés.....	59
2.7.5.	Relations dose-réponse.....	60
2.7.6.	caractérisation du risque.....	61
2.8.	Evaluation de risque microbiologique dans le cas de l'épandage de boues.....	62
2.8.1.	Nature des boues de station d'épuration et justification de l'évaluation de risque microbiologique.....	62
2.8.2.	Identification des dangers.....	63
2.8.2.1.	Agents pathogènes pertinents.....	63
2.8.2.2.	Effets sanitaires observés.....	63
2.8.3.	Estimation des expositions.....	64
2.8.3.1.	Schéma conceptuel et voies d'exposition.....	64
2.8.3.2.	Estimation des quantités d'agents pathogènes dans les boues.....	66
2.8.3.3.	Estimation des quantités d'agents pathogènes dans les médias d'exposition.....	67
2.8.4.	Relations dose-réponse.....	67
	Des modèles dose-réponse, ou plus précisément dose-infection, ont été élaborés pour l'exposition par ingestion de nombreux agents infectieux que l'on peut retrouver dans les boues, en particulier :.....	67
2.8.5.	Caractérisation du risque.....	68
2.9.	Analyse critique de l'étude INERIS : « Bases scientifiques pour l'évaluation des risques sanitaires relatifs aux agents pathogènes » (Convention ADEME/SYPREA/FP2E/INERIS, 2007)..	73
2.9.1.	Identification du danger.....	73
2.9.2.	Sélection des fonctions dose-réponse.....	74
2.9.3.	Estimation des expositions.....	74
2.9.3.1.	Concentrations de pathogènes dans les boues.....	74
2.9.3.2.	Schémas conceptuels et scénarios d'exposition.....	75
2.9.4.	Caractérisation du risque.....	75
2.9.5.	Etude du risque associé aux prions.....	76
2.9.6.	Conclusion.....	76
2.10.	Evolution des paradigmes et cadres conceptuels de l'ERM.....	77
2.11.	Comparaison des approches d'évaluation quantitative du risque microbiologique et du risque chimique.....	78
2.11.1.	Rappel des spécificités du risque microbiologique par rapport au risque chimique ...	78
2.11.2.	Synthèse comparative des approches d'évaluation de risque microbiologique et chimique	80
2.12.	Conclusions générales et perspectives.....	86
2.13.	Références bibliographiques.....	88
3.	Deuxième Partie : Consultation des experts institutionnels.....	91
3.1.	Méthodologie.....	92
3.2.	L'inrs.....	92
3.2.1.	métrologie des bioaérosols.....	92
3.2.2.	Travaux sur les risques biologiques.....	93
3.3.	L'Anses (Afssa).....	94
3.4.	L'Invs.....	95
3.5.	La msa.....	96
3.6.	L'enquete sumer (Dares/Dgt).....	96
3.7.	Références.....	98
3.8.	Annexe 1 : description des dossiers, bases de données et brochures concernant le risque biologique sur le site internet de l'INRS.....	99



## **LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES**

Tableau 2.2-1 : Exemple de présentation transparente des conclusions des différentes étapes de l'ERM qualitative.....	16
Tableau 2.3-1 : Atouts et inconvénients des sources de données utilisables pour l'élaboration des modèles dose-réponse aux agents pathogènes .....	31
Tableau 2.3-2 : Exemples de relations dose-réponse d'agents biologiques cités dans la littérature ...	34
Tableau 2.5-1 : Performances de différentes méthodes de détection de bactéries pathogènes d'après (Lazcka et al., 2007).....	50
Tableau 2.5-2 Performances des méthodes d'amplification génique de détection de germes pathogènes dans les déchets ou assimilés (US-EPA, 2005).....	52
Tableau 2.6-1 : Catégories de déchets susceptibles de renfermer des agents biologiques pathogènes (1) .....	54
Tableau 2.6-2: Catégories de déchets susceptibles de renfermer des agents biologiques .....	55
Tableau 2.6-3 : Activités de la filière déchet étudiées en terme d'ERM.....	56
Tableau 2.7-1 : Publications des institutions britannique concernant le risque liées aux sites de compostage et traitement des déchets .....	57
Tableau 2.8-1 : Résultats d'EQRM sur populations générales liées à l'épandage de boues de station d'épuration (1) .....	71
Tableau 2.8-2 : Résultats d'EQRM sur populations générales liées à l'épandage de boues de station d'épuration (2) .....	72
Tableau 2.11-1 : Approches comparées des évaluations quantitatives de risque microbiologique et chimique (1).....	81
Tableau 2.11-2 : Approches comparées des évaluations quantitatives de risque microbiologique et chimique (2).....	82
Tableau 2.11-3 : Approches comparées des évaluations quantitatives de risque microbiologique et chimique (3).....	83
Tableau 2.11-4 : Approches comparées des évaluations quantitatives de risque microbiologique et chimique (4).....	84
Tableau 2.11-5 : Approches comparées des évaluations quantitatives de risque microbiologique et chimique (5).....	85
Figure 2.2-1 : Les étapes de l'Evaluation du Risque Microbiologique .....	14
Figure 2.2-2 : Modèle de matrice (probabilité-effet) en ERM semi-quantitative (A1, A2, etc. : aléas sanitaires évalués par l'ERM, par exemple : transmission salmonellose par ingestion de viande de bœuf) .....	18
Figure 2.5-1 : Systèmes de prélèvement des aérosols.....	42
Figure 2.8-1 : Schéma conceptuel général pour l'évaluation de risque microbiologique lié à l'épandage de boues non hygiénisées (Class B biosolids) d'après (US-EPA, 2008).....	65

# **1. PROBLÉMATIQUE, OBJECTIFS, ET ORGANISATION DU RAPPORT**

## **1.1. LA DEMANDE DE RECORD**

La demande du groupement RECORD était expliquée clairement dans les termes du cahier des charges, à savoir de disposer d'un rapport permettant de :

- présenter les méthodes d'évaluation des risques sanitaires liés aux micro-organismes, leurs difficultés, leurs limites et leurs applications, par référence à l'évaluation des risques des agents chimiques,
- prendre en compte les transferts des micro-organismes entre les milieux,
- présenter les apports et les limites des nouvelles techniques de quantification des microorganismes, dans le contexte de l'Evaluation de Risque Microbiologique (ERM).

## **1.2. OBJECTIFS DE L'ETUDE**

Afin de répondre à la demande de Record, en prenant en compte les avis émis lors de la réunion de lancement, l'étude s'est efforcée d'atteindre les objectifs suivants :

- décrire la démarche et les méthodes spécifiques utilisées dans l'ERM en montrant les points communs et les différences par rapport à l'approche et aux méthodes classiquement développées dans l'évaluation du risque chimique, notamment en ce qui concerne l'évaluation de l'exposition et la définition des relations dose-réponse.
- décrire les transferts d'agents infectieux dans les différents médias (air, eaux, sols) et chaînes alimentaires (produits animaux et végétaux), les temps de survie et les possibilités de multiplication des agents infectieux dans les différents médias et les outils disponibles pour estimer quantitativement les transferts.
- présenter les diverses approches métrologiques développées pour évaluer les expositions (techniques d'échantillonnage, d'identification et de dénombrement) et caractériser l'apport des nouvelles techniques moléculaires (PCR et autres).
- définir une typologie des déchets et de leurs filières de traitement quant au risque microbiologique qu'ils peuvent générer vis-à-vis des populations générales, sachant que les données de santé professionnelles peuvent être exploitées dans ce cadre.
- rapporter les approches pratiques et concrètes actuellement développées par les institutions françaises en matière d'évaluation de risque microbiologique appliquées à la filière déchet. Cette composante comprendra d'une part une étude critique des principales publications françaises sur le sujet, notamment celle de l'INERIS (INERIS, 2007b) et d'autre part, des résultats d'entretiens avec différentes entités administratives susceptibles de travailler sur le sujet (INRS, ANSES, etc.).

Le travail permettra donc essentiellement de faire un état des lieux actualisé des connaissances, tant théoriques que pratiques, en matière d'ERM applicable à la filière déchets. L'essentiel du travail a reposé sur une recherche et une analyse de la bibliographie pertinente accessible.

### 1.3. ORGANISATION DU RAPPORT

Le rapport se décompose en deux parties :

- la première composée de 12 chapitres, répond aux quatre premiers objectifs et une partie du cinquième:
  - 1- présentation de la méthodologie utilisée pour les recherches bibliographiques et des résultats de ces recherches,
  - 2- description des concepts et des approches génériques développées dans l'ERM,
  - 3- caractéristique et spécificité méthodologiques de l'ERM,
  - 4- transfert et survie des germes dans les différents compartiments environnementaux,
  - 5- techniques d'identification et de dénombrement des agents infectieux,
  - 6- typologie des déchets susceptibles de générer un risque microbiologique dans les populations générale,
  - 7- spécificités méthodologiques des ERM appliquées aux plateformes de compostage,
  - 8- spécificités méthodologiques des ERM appliquées à l'épandage des boues résiduelles non hygiénisées,
  - 9- revue critique de l'étude INERIS intitulée « Bases scientifiques pour l'évaluation des risques sanitaires relatifs aux agents pathogènes (INERIS, 2007b),
  - Les 2 derniers chapitres suivant (10 et 11) traitent de l'évolution du traitement de l'ERM et de sa comparaison avec l'évaluation des risques chimiques,
  - Enfin le chapitre 12 consiste en une synthèse des résultats.
  
- la deuxième partie, relate les résultats des interviews et des consultations des travaux d'institutions.

## **2. PREMIÈRE PARTIE : L'ÉVALUATION DE RISQUE MICROBIOLOGIQUE (ERM)**

## 2.1. MÉTHODOLOGIE UTILISÉE ET RÉSULTATS OBTENUS

### 2.1.1. MÉTHODOLOGIE DE RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

En termes de recherche bibliographique scientifique ou technique, deux types de publications sont généralement disponibles :

- les publications individuelles : il s'agit d'articles publiés dans des revues scientifiques spécialisées ou constituant des chapitres d'ouvrages scientifiques. Les auteurs, généralement groupes de co-auteurs, de ces publications sont clairement indiqués. Dans la plupart des cas, la fiabilité de l'article est garantie par son approbation suite à la revue d'un Comité de lecture constitué d'experts spécialisés, généralement international. Les revues disposant d'un Comité de lecture jugé compétent sont indexées dans la très importante banque de données bibliographiques *Current Contents* compilée par la société américaine ISI (*Institute for Scientific Information*), et qui répertorie environ 5000 périodiques scientifiques publiés à l'échelle internationale. Lorsque qu'une revue est incorporée aux *Current Contents*, il est relativement facile d'en retrouver les articles à travers les moteurs de recherches spécialisés. Dans le cas présent où l'ensemble des données recherchées étaient liées plus ou moins étroitement avec le domaine de la santé, la recherche s'est faite dans la base de données MEDLINE, gérée par la *National Library of Medicine* américaine et accessible librement à travers le portail PubMed. Une fois identifié un article pertinent à l'aide de mots-clés, PubMed en fournit le titre, les auteurs, l'année de publication, la revue, le volume et les N° de page, ainsi qu'un résumé court (limité à 400 mots). On peut alors faire l'acquisition payante de l'article soit par le site internet de l'éditeur ou d'une société spécialisée (librairie scientifique en ligne), soit en le commandant à l'INIST (CNRS). Certaines revues scientifiques de haut niveau permettent l'accès libre à leurs articles, comme par exemple *Environmental Health Perspectives* ou *Journal of Applied Microbiology*, etc.. Si l'article est en accès libre, un lien de téléchargement gratuit est généralement indiqué dans PubMed. Pour la présente étude, la recherche a été effectuée en utilisant le logiciel bibliographique EndNote (X3), qui permet l'accès à PubMed et l'enregistrement direct des références des articles jugés pertinents.

Les mots clés utilisés pour la recherche d'articles ont été principalement les suivants (individuels ou, plus souvent, combinés) : *microbial risk, waste, bioaerosols, biosolids, compost, health risk, risk assessment, pathogens, endotoxins, QMRA (Quantitative Microbial Risk Assessment), land application*.

- les publications factuelles : il s'agit de publications, généralement plus volumineuses que les articles scientifiques (le plus souvent entre 50 et 150 pages) éditées par des institutions publiques ou privées. Les auteurs « physiques » de ces publications, généralement collectives, ne sont pas toujours nommés. Ces publications factuelles peuvent être classées en différentes catégories en fonction de leurs objectifs et du public auquel elles s'adressent, par exemple :
  - synthèses documentaires,
  - guides méthodologiques,
  - monographies scientifiques ou techniques.

La plupart de ces publications sont en accès libre, mais certaines sont payantes. La recherche de ces publications s'est faite :

- soit par les moteurs classiques tels que Google ou Google Scholar et essentiellement en utilisant les mêmes mots-clés que pour la recherche d'articles,
- soit directement sur les sites des institutions pertinentes quand celles-ci étaient connues ou une fois qu'elles avaient été découvertes par la recherche « ouverte ». On peut citer en particulier le site de l'OMS qui, dans sa partie publications, présente un dossier « *Microbiological Risk Assessment Series* ».

Les institutions (non françaises) investiguées qui ont fourni des publications exploitables dans le cas de la présente étude ont été : l'OMS, l'US EPA (USA), le RIVM (Pays-Bas), le HSE et EA (Royaume-Uni) et Santé Canada.

Il va de soi que, les références bibliographiques contenues dans une publication individuelle ou factuelle pertinente ont été également investiguées (recherche rétrospective), en particulier lorsque la publication source était récente. Cette méthode a également permis d'investiguer des domaines périphériques utiles pour la présente étude telles que :

- la survie, la multiplication et le transfert des agents infectieux dans les différents médias,
- les méthodes d'identification et de quantification des agents infectieux et non infectieux.

## **2.1.2. RÉSULTATS DE LA RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE**

La recherche a abouti à la sélection de 186 publications individuelles disponibles *in extenso* (téléchargées ou commandées à l'INIST), et 63 publications factuelles.

Près de la moitié des publications individuelles identifiées ont été publiées postérieurement à l'année 2005 (seules celles publiées après 2004 ont été retenues, les travaux antérieurs ayant déjà été analysés par l'INERIS (INERIS 2007b)). Une cinquantaine d'entre elles sont citées en référence dans ce rapport car apportant des informations importantes et actualisées.

Les publications factuelles ont été publiées par des institutions et pays suivants :

- OMS : 21 publications,
- France : 14 publications,
- Canada : 4 publications,
- Pays-Bas : 5 publications,
- Royaume-Uni : 10 publications,
- Etats-Unis : 9 publications.

Nombre de ces publications comportent plus de 100 pages. Les publications de l'OMS, du Royaume-Uni (Health and Safety Executive et Environmental Agency) et des Etats-Unis (US-EPA) se sont avérées les plus riches en informations.

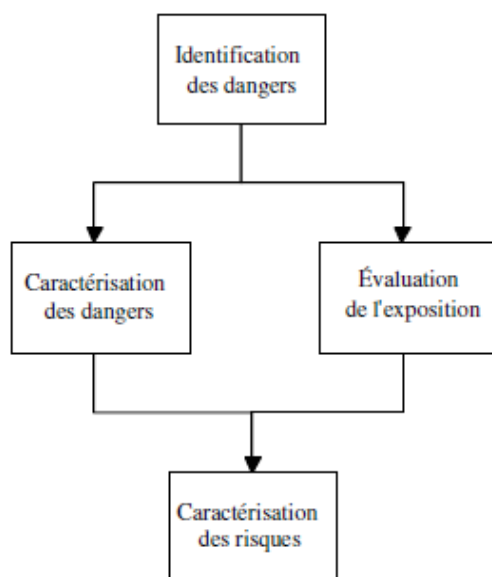
## 2.2. CONCEPTS GÉNÉRAUX ET DIFFÉRENTS TYPES D'ERM

Les concepts méthodologiques décrits dans ce chapitre sont issus, sauf indications contraires, des publications de l'OMS : *Risk characterization of microbiological hazards in food* (WHO, 2009b) et *Caractérisations des dangers liés aux pathogènes microbiologiques présents dans les aliments et l'eau* (OMS, 2004).

### 2.2.1. OBJECTIFS, DÉFINITIONS ET DOMAINES D'APPLICATION

L'ERM a été élaborée en premier lieu, historiquement et opérationnellement, pour évaluer la sécurité sanitaire de l'eau de boisson et des aliments. C'est pourquoi des organisations comme la FAO et l'OMS ont joué et jouent toujours un rôle central dans la définition et la standardisation des protocoles afférents à la démarche de l'ERM au niveau international. Ainsi, les principes de l'ERM sont clairement énoncés dans les Directives émises par le *Codex Alimentarius Council* (CAC, 1999) qui réglementent la qualité des aliments faisant l'objet d'échanges internationaux. Le Codex décrit la réalisation d'une ERM comme la succession de quatre étapes, à savoir (cf. Figure 2.2-1) :

- 1) Identification des dangers (avec généralement en préalable, la formulation du problème),
- 2) Caractérisation des dangers,
- 3) Estimation de l'exposition,
- 4) Caractérisation du risque, synthétisant les trois étapes précédentes.



**Figure 2.2-1** : Les étapes de l'Evaluation du Risque Microbologique

Cette décomposition en étapes est fortement inspirée de celle appliquée à l'évaluation de risque chimique, définie par l'Académie des Sciences des Etats-Unis et mise en œuvre par l'US-EPA depuis les années 70 et, progressivement depuis, par les autres pays industrialisés (fin des années 90 en France).

Cependant, les microorganismes se distinguent fondamentalement des substances chimiques, principalement par leur capacité à se reproduire dans l'environnement et pour certains d'entre eux, dans les organismes humains (hôtes). De plus certains agents peuvent aussi transmettre d'individus à individus (transmission secondaire). Par ailleurs, certains individus peuvent développer une immunité contre des agents.

Par conséquent, comme il sera indiqué plus bas, certaines étapes nécessitent des approches et des méthodologies spécifiques au risque microbologique, différentes de celles applicables aux risques chimiques.

Le CAC définit également les principaux critères de qualité d'une ERM :

- l'ERM doit être basée sur les meilleures techniques ou connaissances disponibles et être présentée de manière transparente,
- les contraintes afférentes à l'ERM (coûts, ressources et temps nécessaire) doivent être clairement identifiées ainsi que leurs conséquences éventuelles,
- les objectifs de l'ERM ainsi que la forme et le mode d'expression attendus de l'estimation du risque doivent être indiqués,
- les considérations relatives à la croissance, à la survie et la mort des microorganismes dans la nourriture, celles relatives aux interactions complexes entre l'agent et organisme humain ayant consommé la nourriture contaminée et les possibilités de dissémination ultérieure de la maladie doivent être spécifiques à ou aux agents incriminés,
- les données prises en compte doivent pouvoir donner lieu à une étude des incertitudes associées à l'estimation du risque et leur qualité doit être telle que ces incertitudes soient minimisées,
- l'ERM doit être conduite suivant les quatre étapes d'identification des dangers, de caractérisation des dangers, d'estimation des expositions et de caractérisation du risque.

En ce qui concerne la santé humaine, l'ERM est appliquée particulièrement, mais non exhaustivement, aux domaines suivants :

- qualité sanitaire de l'eau de boisson
- qualité sanitaire des aliments (légumes, poissons, fruits de mers, viandes, produits laitiers), en particuliers lorsque les aliments sont consommés sans cuisson ou importés de zones où les conditions d'hygiène ne sont pas maîtrisées,
- qualité sanitaire des eaux de baignades et de loisirs, en particulier quand elles reçoivent des eaux usées, traitées ou non,
- épandage agricole des fertilisants/amendements organiques d'origine animale (fumier et lisier),
- épandage agricole des boues de station d'épuration (STEP),
- conditions de travail dans les établissements d'élevage (notamment volailles),
- condition de travail dans les unités de compostage.

De plus, dans la dernière décennie, l'émergence du risque d'attentats biologiques, notamment par dissémination de spores de *Bacillus anthracis*, agent de la maladie du charbon (*anthrax* en anglais) a également créé une forte demande en recherches sur la connaissance du risque microbiologique de la part de la Défense Nationale américaine (US-EPA, 2007).

Il faut noter que la démarche ERM est également utilisée pour la santé animale, qu'il s'agisse d'animaux d'élevage ou d'animaux sauvages, par exemple pour évaluer le risque lié à l'introduction (ou réintroduction) d'espèces nouvelles en milieu naturel, sur l'état sanitaire des espèces autochtones.

Selon les objectifs affichés et les résultats escomptés, on peut distinguer trois types d'ERM dont les descriptions font l'objet des prochains paragraphes :

- l'ERM qualitative,
- l'ERM semi-quantitative,
- l'ERM quantitative.

### **2.2.2. EVALUATION QUALITATIVE DE RISQUE MICROBIOLOGIQUE (ERM QUALITATIVE)**

L'évaluation qualitative de risque microbiologique (ERM qualitative) présente les mêmes exigences méthodologiques, de rigueur et de transparence que l'ERM quantitative décrite ultérieurement, la différence résidant dans la méthode de synthèse des données collectées et dans la formulation des



résultats, non sous forme de valeurs numériques, mais sous une forme descriptive ou catégorielle (risque de niveau élevé, moyen, modéré, négligeable, etc.). L'approche qualitative peut être utilisée comme préliminaire à une étude quantitative mais est généralement un outil suffisant d'aide à la décision. C'est d'ailleurs, dans la pratique, le type d'ERM le plus souvent pratiqué.

L'ERM qualitative ne dispense pas le recours aux données quantitatives, qui deviennent nécessaires à moins que les paramètres caractérisant le risque (taille de l'inoculum, virulence, sensibilité des populations, etc.) soient très peu nombreux c'est-à-dire en général inférieurs à 4. Au-delà, il devient très difficile de « combiner » des indicateurs qualitatifs. Comme la caractérisation du risque se formule en termes descriptifs ou catégoriels, elle fait appel à des notions subjectives qui peuvent varier d'un évaluateur à un autre, d'où la nécessité d'une démarche transparente, avec une justification claire des différentes hypothèses et jugements.

Deux types de données sont nécessaires à l'ERM qualitative :

- les données permettant d'établir le cheminement du risque depuis la source de contamination jusqu'à sa pénétration dans l'organisme, ces données aboutissant à la présentation d'un cadre de modèle (par exemple sous forme d'un schéma avec compartiments et flux),
- les données permettant de quantifier les paramètres du modèle.

L'évaluation qualitative doit énoncer clairement les incertitudes et les données manquantes. Afin d'assurer la transparence du raisonnement, à chaque étape du cheminement du risque, les données disponibles et les conclusions doivent être reportées et confrontées dans un même tableau, (colonnes de droite et de gauche ou lignes supérieure et inférieure, cf. Tableau 2.2-1)

:

**Tableau 2.2-1** : Exemple de présentation transparente des conclusions des différentes étapes de l'ERM qualitative

Intitulé de l'étape du cheminement		Intitulé de l'étape du cheminement	
Données disponibles	Conclusions	Données disponibles	
		Conclusions	

Classiquement, l'ERM qualitative aboutit à une catégorisation des niveaux de risque en croisant dans une « matrice de risque » des critères relatifs à la probabilité d'occurrence de la contamination et des critères qualitatifs relatifs à la gravité des conséquences de celle-ci. Les critères qualitatifs sont le plus souvent basés sur des données quantitatives, par exemple : la sévérité d'une infection est jugée « haute » lorsqu'elle provoque la mort ou des effets à long terme dans plus de 5 % des cas.

Ce type de démarche formalisée par le *Codex Alimentarius Council* (CAC, 1999) a été appliqué par exemple, par l'OMS pour la classification des risques résultant du rejet d'eaux usées sur les côtes en fonction du type de traitement (primaire, secondaire, désinfection, etc.) et de la configuration rejet (rejet direct, émissaire court, émissaire long).

L'Agence Européenne de Sécurité Alimentaire (AESA) a utilisé l'ERM qualitative en 2002 pour caractériser le risque de contamination par l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) par la consommation de lait et fromage de chèvre alors que la présence de prions dans ces produits n'était pas quantifiable. Un autre exemple est l'évaluation géographique (comparée par pays) du risque d'infection du bétail par l'ESB réalisé par l'AESA en 2003 (cité dans (WHO, 2009b)).

En santé animale, une démarche structurée d'estimation qualitative du risque a été développée depuis une vingtaine d'année par l'OIE (Organisation Mondiale de la Santé Animale, anciennement Office International des Epizooties) et a fait l'objet d'une publication récente de l'AFSSA (AFSSA, 2008). Cette démarche consiste en quatre étapes :

- appréciation des émissions : consiste à approcher de manière qualitative (par des mots) ou quantitative (par des chiffres) la probabilité de l'émission, c'est-à-dire la probabilité de la production du danger à sa source (par exemple, détermination de la probabilité d'introduire dans un pays, un animal infecté d'une maladie),

- appréciation de l'exposition : consiste à approcher, qualitativement ou quantitativement, la probabilité que des animaux ou des personnes (s'il s'agit de zoonoses) soient exposés au danger considéré (par exemple : probabilité que l'introduction d'un animal infecté dans un pays puisse entraîner des cas dans le pays importateur),
- appréciation des conséquences : consiste à décrire les effets néfastes de la survenue du danger. Il peut s'agir de conséquences directes (comme des pertes économiques pour l'élevage, dans le cas des zoonoses, de conséquences pour la santé publique), ainsi que de conséquences indirectes (pertes de marchés à l'exportation, pertes de confiance du consommateur),
- estimation du risque : issue de combinaisons des résultats des étapes antérieures. Ainsi, le croisement de la probabilité d'émission et de la probabilité d'exposition permet de déterminer la probabilité de survenue du danger. Puis la combinaison de cette probabilité de survenue du danger et des conséquences permet finalement d'estimer le risque. La notion d'estimation du risque est différente de celle de l'évaluation de risque, résultat de l'appréciation.

Ce sont donc d'abord les résultats des appréciations des émissions et des expositions qui sont croisés à l'aide d'une grille de croisement pour constituer l'appréciation de la probabilité de survenue. Les résultats de cette dernière sont ensuite croisés avec ceux de l'appréciation des conséquences, également à l'aide d'une grille. Les grilles de croisements, mettant en correspondance des qualificatifs estimés collégialement par les experts et une échelle ordinale à 9 niveaux (de « nulle » à « très élevée »), ainsi que les règles de croisements sont présentées dans le document de l'AFSSA. Par le biais des zoonoses, cette démarche s'applique également à la santé humaine.

### **2.2.3. EVALUATION SEMI-QUANTITATIVE DE RISQUE MICROBIOLOGIQUE (ERM SEMI-QUANTITATIVE)**

L'évaluation semi-quantitative de risque microbiologique (ERM semi-quantitative) permet de classer/hierarchiser un grand nombre de risques sans passer par les calculs numériques fastidieux de l'ERM quantitative. Cette approche est développée de préférence lorsque l'on cherche à classer/prioriser les actions de réduction des risques et/ou que l'on doit décider des ressources (financement, ressources humaines, etc.) à attribuer aux actions. L'ERM semi-quantitative doit permettre, d'une part de distinguer les risques majeurs des risques mineurs, mais également de juger des risques résiduels après application des mesures de réduction des risques.

L'ERM semi-quantitative utilise une description non technique (non numérique) de la probabilité d'occurrence d'un effet sanitaire causé par un germe pathogène dans certaines conditions d'exposition (aléa sanitaire), et une description de la gravité de l'effet sanitaire. La combinaison de la probabilité et de la gravité est appelée sévérité (*severity* en anglais) par l'OMS (OMS, 2004). En fait, la probabilité de l'effet sanitaire est généralement une combinaison de la probabilité d'être exposé au germe responsable et de la probabilité de développer une maladie après exposition. L'ERM semi-quantitative utilise une catégorisation de la probabilité et de la gravité en plusieurs niveaux d'importance, qui doit obéir à des règles claires et exposées avec transparence afin qu'elles puissent être appliquées de manière analogue à l'ensemble des cas que l'on veut comparer. Le nombre de niveaux doit être limité dans un souci de faisabilité et une échelle à cinq niveaux (par exemple : très haut, haut, moyen, bas, très bas) se montre la plus fréquemment adoptée. La catégorisation repose sur des données chiffrées (données de consommation, données sanitaires, etc.) ou des données qualitatives (effets réversibles, entraînant une hospitalisation, avec séquelles à long terme, etc.). Une matrice probabilité/gravité est ainsi constituée (cf. Figure 2.2-2) qui définit, aux croisements des lignes et des colonnes, des niveaux de sévérité.

EFFET	Très Haut	A1			A7	
	Haut			A2		
	Moyen			A5		
	Bas					
	Très Bas			A3, A4, A6		
		Très Bas	Bas	Moyen	Haut	Très Haut
PROBABILITE (ou NOMBRE DE CAS)						

Haute sévérité

Moyenne sévérité

Basse sévérité

**Figure 2.2-2 :** Modèle de matrice (probabilité-effet) en ERM semi-quantitative (A1, A2, etc. : aléas sanitaires évalués par l'ERM, par exemple : transmission salmonellose par ingestion de viande de bœuf)

L'estimation de la sévérité peut également recourir à une méthode numérique (notation ou *scoring*) en attribuant un score aux différentes catégories d'effet et de probabilité et en combinant ces scores par diverses opérations : somme, produit, minimum, etc.. Il n'existe cependant aucune méthode ou règle parfaite ou universelle pour une telle démarche et l'on atteint là les limites de l'ERM semi-quantitative.

Les conséquences d'une maladie ne sont pas seulement d'ordre sanitaire mais peuvent être par exemple d'ordre économique ou social et les effets de celle-ci peuvent être différents selon les différents points de vue. L'ERM semi-quantitative peut être appliquée à une telle approche multidimensionnelle, des matrices ou des notations pouvant être constituées pour les différents ordres de préoccupation. Une notation globale pour l'ensemble des dimensions prises en compte peut être réalisée en prenant par exemple, la note minimale ou encore la moyenne logarithmique des notes.

Un exemple connu d'utilisation d'ERM semi-quantitative est l'établissement de profils de risque d'un grand nombre d'infections alimentaires (aléa : germe x type d'aliment) par les Autorités sanitaires de Nouvelle-Zélande (Lake et al., 2002). Dans cette ERM, la probabilité de l'effet était estimée par les taux d'incidence des différentes infections alimentaires (listérioses, salmonelloses, shigelloses, etc.) au niveau national (4 catégories : de < 1 cas /100 000 hab. à > 100 cas /100 000) et la gravité estimée par la proportion de cas donnant lieu à des effets sanitaires critiques (3 catégories: de > 0,5 % à > 5 %).

#### 2.2.4. EVALUATION QUANTITATIVE DE RISQUE MICROBIOLOGIQUE (EQRM)

L'EQRM est un processus techniquement plus fin et plus sophistiqué que les autres types d'ERM (qualitative ou semi-quantitative) mais il met en jeu des moyens plus importants en termes techniques et de temps de travail, et les méthodes sont souvent difficiles à appréhender par le public.

Comme pour les autres ERM, l'EQRM revient à appréhender, de manière quantitative cette fois-ci, et à combiner d'une part la probabilité d'un aléa sanitaire (problème de santé lié à l'exposition à un agent pathogène sanitaire d'origine microbiologique) et d'autre part, la gravité de cet aléa. Cependant, en ce qui concerne plus particulièrement les maladies liées à l'eau potable et aux aliments, les EQRM sont conduites de manière individuelle, pour un seul germe bien identifié et un média (ou un groupe de médias) d'exposition, par exemple : *Vibrio vulnificus* dans les huîtres crues, *Escherichia coli* O157 dans le steak tartare, *Listeria monocytogenes* dans le fromage, *Cryptosporidium parvum* dans l'eau de boisson, etc.).

Les risques quantitatifs issus de l'EQRM peuvent être formulés de différentes manières telles que :

- probabilité pour un individu de contracter une maladie causée par un germe G par exposition à un média M pendant une année, ou pendant toute sa vie,
- le nombre de cas, ou de journées d'hospitalisation, attendus causées par un germe G transmis par un média M dans une population, etc..

Les étapes cruciales de l'EQRM sont la construction de la fonction (ou plus exactement du modèle) dose-réponse (caractérisation du risque) et l'estimation des expositions qui sont toutes deux marquées par un caractère aléatoire, et une variabilité inhérente à la nature biologique des phénomènes, propriétés qu'il faut savoir distinguer de l'incertitude, liée à l'observateur extérieur et qui reflète le niveau de confiance que l'on place dans une mesure ou une hypothèse de travail. Des modèles dits de second ordre permettent de distinguer la variabilité de l'incertitude.

## **2.3. CARACTÉRISTIQUES ET SPÉCIFICITÉS MÉTHODOLOGIQUES D'UNE ERM**

### **2.3.1. FORMULATION DU PROBLÈME**

Avant de commencer une ERM, il convient d'en définir soigneusement le contexte, les objectifs et la portée. En ce sens, l'énoncé du problème revêt une grande importance étant données la complexité des phénomènes impliqués et les nombreuses interactions possibles entre les pathogènes, les matrices et les populations cibles.

La revue des points suivants, inspirée de la méthodologie appliquée par l'OMS (OMS, 2004) permet de mieux formuler l'énoncé du problème et la méthodologie pertinente à développer :

- agents pathogènes pertinents pour l'ERM,
- voies, médias et matrices potentiels d'exposition,
- influence des différentes matrices sur l'action délétère des agents pathogènes,
- caractéristiques de chaque agent pathogène ayant une incidence sur son aptitude à causer une maladie chez l'hôte (par exemple : toxicité (toxines), pouvoir allergène, infectiosité, pathogénicité, virulence),
- nature des effets adverses sur la santé associés à l'exposition aux agents pathogènes (effets bénins, effets entraînant une hospitalisation, effets avec séquelles à long terme, effets potentiellement mortels, etc.),
- définition et caractérisation de la population cible, ou de la population « à risque » (par exemple : population professionnelle ou générale, classes d'âges, conditions socioéconomiques, etc.),
- caractéristiques de la population exposée susceptibles d'influencer sa sensibilité aux pathogènes (âge, état immunitaire, maladie concurrente, traitement médical, patrimoine génétique, grossesse, état nutritionnel, statut social, caractéristiques comportementales),
- fréquence d'apparition de maladies suite à l'infection : exposition aux agents pathogènes,
- voies potentielles de transmission intra-populations.

Certaines des notions mentionnées ci-dessus seront explicitées dans les prochains chapitres. La revue de ces différents points permettra en premier lieu de sélectionner les agents biologiques pathogènes à prendre en compte dans l'étude, par exemple ceux pour qui il existe un modèle dose-réponse connu, ou encore les plus préoccupants du point de vue sanitaire vis-à-vis de la sensibilité des populations cibles.

S'il s'agit de construire entièrement le modèle dose-réponse, devant l'ampleur de la tâche, on se contentera généralement d'un seul agent pathogène par étude. Les informations permettront également de définir les schémas conceptuels et scénarios d'exposition, d'évaluer la qualité et la pertinence des données disponibles, d'identifier les modèles de risque et d'améliorer le niveau de communication autour des risques identifiés.

## 2.3.2. IDENTIFICATION DU DANGER

### 2.3.2.1. Caractérisation de l'agent pathogène

#### **Types d'agents pathogènes et méthodologie d'évaluation du risque**

En évaluation du risque chimique, l'identification des dangers consiste à identifier les effets toxiques d'une substance donnée. La notion de « substance » ne correspond pas toujours à une entité chimique ou toxicologique : c'est bien le cas pour les molécules organiques, bien que la chiralité (stéréospécificité) puisse parfois influencer la toxico-dynamique (cas de l'oxyde de styrène), mais ce n'est pas le cas pour les éléments métalliques, par exemple. Les métaux entrent dans la composition de nombreux composés minéraux sous divers degrés d'oxydoréduction ou se retrouvent inclus dans des molécules organiques. Dans ce cas, la « spéciation » de l'élément peut s'avérer essentielle pour en définir la toxicité (cas du chrome III/chrome IV ou mercure métallique/méthylmercure).

En ce qui concerne le risque biologique, l'agent biologique pathogène peut être :

- un agent infectieux : microorganisme (germe) ou autre agent doué d'autoreproduction (cas des prions),
- un agent non infectieux (agent biochimique) : molécule complexe à propriétés toxiques, produite par un microorganisme, infectieux ou non.

La démarche d'évaluation du risque est différente pour ces deux types d'agents. En effet, l'évaluation du risque lié à un agent non infectieux (biochimique) peut se faire selon l'approche classique appliquée aux substances chimiques toxiques à condition que sa concentration/dose d'exposition soit mesurable (ou plus exactement, estimable) sans qu'il soit nécessaire de connaître les conditions de développement du microorganisme qui l'a produit. C'est, par exemple, le cas des endotoxines inhalées par les éleveurs de volailles ou les employés d'unités de compostage : ces substances sont en effet mesurables dans l'air et leurs effets peuvent être estimés sans connaître spécifiquement les microorganismes qui les ont synthétisés. Dans le cas contraire, où il faudra évaluer le développement du microorganisme producteur, c'est l'approche spécifique de l'ERM qui devra être développée. Cela peut s'appliquer aux toxines produites par des bactéries dans les aliments et qui y demeurent même après la disparition des bactéries (cas des entérotoxines produites *Staphylococcus aureus* qui résistent à la cuisson). En fait, le pouvoir pathogène de nombreux germes dits toxico-infectieux, est dû à leur capacité de produire des toxines lors de leur prolifération dans l'organisme humain (par exemple, la shigatoxine libérée par *E. coli* O157:H7), dans ce cas, le risque sera bien évalué par la méthodologie ERM.

Les paragraphes suivant décrivent les agents biologiques non infectieux et infectieux. Ces agents appartiennent à diverses catégories d'êtres vivants, parfois très éloignés génétiquement, d'ailleurs les noms utilisés pour désigner ces catégories font plus référence à la classification du vivant des biologistes de la première moitié du XXème siècle, qu'à celles issues des dernières avancées de la phylogénétique rendues possibles par le développement des techniques de génétique moléculaire. Ces catégories génériques sont les suivantes (INERIS, 2001) :

- bactéries
- virus
- champignons (mycètes)
- protozoaires
- helminthes (« vers plats » et « vers ronds »)
- protéines infectieuses (prions)

Il faut noter que les helminthes et protozoaires sont généralement regroupés sous l'appellation de « parasites ». Les descriptions suivantes des différents groupes d'agents pathogènes sont issues de la consultation de nombreuses publications et ouvrages, dont notamment *Introduction à la microbiologie* (Tortora et al., 2003) et *Le risque biologique et la méthode d'évaluation du risque* (INERIS, 2001).

#### **Agents non infectieux (biochimiques)**

Il sera question ici de molécules complexes d'origine biologique non spécifiques de germes donnés et susceptibles d'être mesurées dans le milieu d'exposition (dans l'air le plus fréquemment). Les agents

de ce type les plus souvent cités sont les endotoxines, le peptidoglycane et le bêta-(1-3)-glucane. Il est important de préciser que ces agents biochimiques, ainsi que leur pouvoir pathogène, subsistent bien après la mort (lyse) des microorganismes qui les ont synthétisés et peuvent donc être transmis par des sources plus ou moins dépourvues de germes pathogènes viables, par exemple, suite à un processus d'hygiénisation tel que le compostage.

Les **endotoxines** sont des constituants de la membrane externe des bactéries Gram négatives (Gram(-)) qui sont libérés lors de la lyse des cellules bactériennes ou lors de leur multiplication. Le terme d'endotoxine vient du fait que ces substances ne sont pas destinées à être excrétées, comme le sont les exotoxines. Les endotoxines sont des lipopolysaccharides (LPS) dont une portion de molécule, appelée lipide-A, commune à de très nombreuses espèces de bactéries Gram(-) est à l'origine des effets pathogènes. Les endotoxines sont résistantes à de nombreux agents chimiques et physiques, notamment à la chaleur (destruction au bout de 7 heures à 126 °C). Elles agissent par déclenchement de la réponse immunitaire (stimulation des macrophages) qui résulte en la libération dans le sang de l'individu hôte de puissants médiateurs à l'origine de fièvre, hypertension, coagulation intravasculaire pouvant, en présence de fortes doses, entraîner la mort. Par inhalation, les endotoxines entraînent des symptômes respiratoires tels que toux sèche, hyperréactivité bronchique, dyspnée et diminution des performances respiratoires (INERIS, 2007a). Les individus asthmatiques et atopiques présentent une sensibilité exacerbée aux endotoxines (NRC, 2002), (Srikanth et al., 2008). Mais les endotoxines stimulent également la sécrétion de médiateurs antinéoplasiques, qui inhiberaient l'initiation et la prolifération des cellules tumorales. Cet effet protecteur contre le cancer du poumon est supporté par une méta-analyse récente sur les travailleurs secteur textile (coton), là où les taux d'endotoxines dans l'air sont les plus élevés (Lenters et al., 2010). Bien qu'elles ne rendent pas compte de la viabilité des germes, les endotoxines sont parfois utilisées du point de vue métrologique comme indicateurs des bactéries Gram(-) dans les aérosols (Rylander, 1999).

Le **peptidoglycane** est un composant de la paroi cellulaire des bactéries Gram positives (Gram(+)) et contribue également, mais en moindre proportion aux membranes des bactéries Gram(-). Ses mécanismes d'action seraient également de type inflammatoire (stimulation des macrophages, granulocytes et leucocytes et libération de médiateurs de type interleukine (INERIS, 2001)).

Le **bêta-(1-3)-D-glucane** est un polymère du glucose constitutif de la paroi cellulaire des champignons, des plantes et de certaines bactéries. Il est cependant considéré comme représentatif de la présence des champignons et parfois mesuré comme indicateur de ces organismes. Il est également responsable de symptômes respiratoires par activation du système immunitaire (Srikanth et al., 2008). Le dosage du bêta-(1-3)-D-glucane est parfois utilisé comme indicateur de la quantité de cellules/spores de champignons et des substances pathogènes qu'ils renferment, y compris mycotoxines et allergènes (Rylander, 1999).

Parmi les autres substances biochimiques impliquées dans les processus pathogènes, il faut citer les nombreuses **substances allergènes** produites par les bactéries, les champignons et les végétaux supérieurs (dont allergènes polliniques), mais également par les animaux telles que les blattes et les acariens qui peuvent proliférer dans certains milieux, tels que les déchets ménagers. Les substances allergènes sont généralement de nature protéinique ou glyco-protéinique. Elles provoquent des réactions immunitaires exacerbées (hypersensibilité) chez les hôtes sensibilisés suite à une exposition antérieure à ces substances. La propension à développer des réactions d'hypersensibilité varie selon les individus et est maximale chez les sujets dits « atopiques ». Lorsqu'elles sont identifiées, les substances allergènes peuvent être dosées par des réactions immuno-enzymatique.

### ***Bactéries***

Les bactéries sont des organismes procaryotes (matériel génétique non isolé dans un noyau) en forme de sphères, de bâtonnets, de spirales ou autres et de taille généralement comprise entre 0,1 et 10 µm. La systématique bactérienne a depuis quelques années entamé une révolution qui n'est pas encore terminée, passant d'une approche phénétique basée sur la morphologie/physiologie à une approche phylogénétique basée sur la génétique moléculaire. Cependant, de nombreux termes encore présents dans la littérature, seront cités dans ce rapport. Les bactéries (ou plus précisément les Eubactéries) ont été depuis longtemps séparées en deux groupes correspondant à leur réaction à la coloration de Gram, elle-même liées à la composition de leur membrane cellulaire :

- les bactéries Gram positives ou **Gram(+)** qui regroupent entre autres les genres *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycoplasma*, *Listeria* et *Clostridium* et la famille des Actinomycètes, que l'on appelle aujourd'hui Actinobactéries. De nombreuses bactéries Gram(+) sont pathogènes :

Bacillus anthracis (maladie du charbon ou anthrax en anglais), Staphylococcus aureus (responsable de septicémie), Mycoplasma pneumoniae (pneumonie), Listeria monocytogenes (listériose), Clostridium botulinum (botulisme), Mycobacterium tuberculosis (tuberculose). Nombre de ces bactéries présentent des formes de résistance (endospores) qui survivent dans des conditions de déshydratation poussée et à des températures élevées. Les Actinomycètes, comptent notamment les genres Mycobacterium, Actinomyces, Streptomyces et Nocardia, ces trois derniers genres regroupant des bactéries filamenteuses dont certaines émettent des spores reproductrices (conidies), produisent des antibiotiques et rappellent la morphologie des champignons. Une grande partie des espèces d'Actinomycètes vivent dans le sol et participent activement à la transformation de la matière organique dans le processus de compostage.

- les bactéries Gram négatives ou **Gram(-)** regroupent de très nombreuses espèces. Parmi les genres présentant des espèces pathogènes, on peut citer les genres Escherichia, Salmonella, Shigella, Serratia et Yersinia qui font tous partie des Entérobactéries, ainsi que Legionella, Vibrio, et Pasteurella. Ces bactéries Gram(-) n'ont pas de formes de résistance.
- les **cyanobactéries** sont également des bactéries Gram(-) mais douées de propriétés photosynthétiques liées à la présence de pigment. Elles ressemblent et présentent la même écologie que certaines algues eucaryotes, ce qui les a fait longtemps classer par les botanistes comme algues bleu ou bleu-vert ou encore Cyanophycées. Ces bactéries très généralement aquatiques ne vivent pas à l'intérieur du corps humain mais sont connues pour leur libération de toxines (neurotoxines, hépatotoxines ou toxines à action cutanée) dans les plans d'eau où elles peuvent proliférer inconsidérément suite à certains apports nutritionnels (bloom algal lié à l'eutrophisation). Certaines cyanobactéries présentent des formes de résistance.

Les bactéries présentent des métabolismes très divers, l'oxygène leur est parfois nécessaire (aérobies stricts), parfois non nécessaire (aérobies facultatifs) ou toxique (anaérobies stricts)

Le pouvoir pathogène des bactéries est principalement lié soit à leur caractère invasif (réaction immunitaire), soit aux toxines ou agents allergènes qu'elles produisent. La connaissance de l'espèce bactérienne n'est souvent pas suffisante pour en évaluer leur pouvoir pathogène. Au sein d'une même espèce, se distinguent différentes souches montrant des spécificités génétiques plus fines entraînant des différences antigéniques (sérotypiques). Ces souches appelées également sérovars ou sérotypes peuvent présenter des pouvoirs pathogènes très différents. C'est notamment le cas d'*Escherichia coli* (*E. coli*) ou de *Salmonella enterica* :

- ***Escherichia coli*** (*E. coli*) est l'une des bactéries les plus fréquentes de la flore intestinale humaine et n'est généralement pas pathogène. Par contre, 4 types d'*E. coli* sont connus pour leur pathogénicité chez l'homme, que l'on distingue selon leur action toxique : les entéro-pathogènes (entéro-pathogenic *E. coli* ou EPEC), les entéro-toxinogènes (ETEC), les entéro-invasives (EIEC) et les entéro-hémorragiques (EHEC). Toutes sont responsables de gastro-entérites plus ou moins graves. Un des sérotypes les plus préoccupants du point de vue sanitaire, l'*E. coli* O157:H7 est une souche entéro-hémorragiques (EHEC) qui libère des shigatoxines (vérocytoxines) qui causent une inflammation aiguë du colon avec saignement. Ces toxines peuvent également toucher les reins et causer le syndrome hémolytique urémique, et peut se compliquer en arthrite réactionnelle, syndrome de Reuter ou de Guillain-Barré. La désignation O157:H7 signifie que cette souche présente l'antigène somatique O157 et l'antigène flagellaire H7.
- Les espèces du genre *Salmonella* sont toutes potentiellement pathogènes pour l'homme ou les animaux (*S. typhi* est par exemple responsable de la fièvre typhoïde). Parmi les pathogènes de l'homme, l'espèce ***Salmonella enterica*** ne compte pas moins de 2300 sérotypes. Un sérotype particulièrement préoccupant chez l'homme est le Typhimurium, de sorte que *Salmonella enterica* ser. Typhimurium est fréquemment appelée dans les publications scientifiques *Salmonella typhimurium*, ce qui n'est pas pleinement conventionnel du point de vue de la systématique bactérienne.

Il faut noter enfin que certains sérotypes d'espèces bactériennes sont résistants aux antibiotiques, par exemple la résistance de *Salmonella* non typhi aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération est apparue en France depuis quelques années.

## **Champignons**

Les champignons (plus exactement Eumycètes, encore appelés mycètes) sont des Eucaryotes (cellules contenant au moins un noyau et certains organites) de formes et tailles très diverses, unicellulaires (levures) ou pluricellulaires. Leur développement est favorisé par l'humidité et ils se nourrissent de matières en décomposition (saprophytes) ou plus rarement de matière vivante (parasites). Les champignons pluricellulaires se développent généralement sous forme de filaments (mycélium) et se reproduisant par des spores sexuées ou asexuées. Ces spores présentent une certaine résistance à la sécheresse et à la chaleur, mais bien moindre que les endospores des bactéries Gram(+). Les champignons se développent très facilement sur les déchets organiques et jouent un rôle prépondérant, au côté des Actinobactéries, dans le processus de compostage. Les champignons pathogènes chez l'homme sont de petites tailles, voire microscopiques et appartiennent généralement aux groupes des :

- Zygomycètes : genres *Rhizopus* et *Mucor*
- Ascomycètes : genre *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Sporothrix*, *Coccidioides*, *Candida* (levure), *Pneumocystis*, *Pneumococcus* etc.
- Basidiomycètes : *Cryptococcus*, etc.

Les effets pathogènes des champignons se présentent sous formes de :

- Mycoses : développement chronique du champignon dans l'organisme. Les mycoses sont principalement de quatre types :
  - mycoses systémiques (profondes) provoquées par l'inhalation de spores (non transmissibles),
  - mycoses sous-cutanées causées par l'implantation de spores ou de mycélium de certains champignons saprophytes (par exemple, *Sporothrix*) dans une plaie,
  - mycoses cutanées causées par des champignons appelés dermatophytes qui secrètent une kératinase, ces mycoses se transmettent d'humain à humain ou d'animal à humain par contact direct ou indirect (planchers de douches, salons de coiffure, etc.),
  - mycoses superficielles occupant les poils ou les cellules épidermiques, fréquentes surtout sous des climats tropicaux humides.

Les mycoses apparaissent en général très lentement et après une exposition longue, mais une fois installées, elles sont très difficiles, voire impossibles, à éliminer.

- Développement opportuniste chez les individus affaiblis, sous médicaments immunosuppresseurs, ou immunodéprimés (atteints du SIDA). Ces infections opportunistes sont causées par des champignons responsables en temps normal de mycoses bénignes, mais qui dans ces conditions de défaillance immunitaire peuvent provoquer jusqu'à la mort de l'individu infecté, car elles sont très difficiles à traiter. Les espèces les plus souvent responsables d'infections opportunistes appartiennent aux genres *Pneumocystis*, *Stachybotrys*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus* et *Candida*.
- Production de toxines (mycotoxines). Ces toxines sont produites par de nombreuses espèces et sont localisées dans le mycélium ou dans les spores. Elles peuvent être inhalées, ingérées ou également absorbées par la peau car liposolubles. Parmi celles-ci, on peut citer les aflatoxines produites par *Aspergillus flavus* qui peuvent contaminer les dépôts alimentaires (arachides) et sont cancérigènes, les neurotoxines de l'ergot de seigle (*Claviceps purpurea*) et les trichothécènes produites par *Stachybotrys* qui peuvent provoquer des hémorragies pulmonaires fatales chez le nourrisson en cas d'infections opportunistes.
- Les effets inflammatoires et allergènes de certains composés de la paroi des cellules de champignons tels que le bêta-(1-3)-glucane.

Les effets sanitaires des champignons, susceptibles d'être à la fois de nature inflammatoire et immuno-allergique, sont de plus en plus étudiés dans la problématique des logements insalubres et également des plateformes de compostage (cf. § 8.3).



### **Protozoaires**

Les protozoaires sont des êtres eucaryotes unicellulaires et chimio-hétérotrophes (se nourrissant de matières organiques uniquement). Le terme « protozoaire » ne correspondant d'ailleurs pas à une entité taxonomique (monophylétique) mais plutôt à un ancien niveau de classification du vivant, simple à utiliser. Leur taille varie généralement de 10 à 100 µm (quelques µm pour les formes enkystées), ils se déplacent à l'aide de cils, de flagelles ou par déformation de leur cellules (pseudopodes des amibes) et certains présentent des formes de résistance appelées kystes. La systématique des protozoaires est extrêmement complexe, mais il est néanmoins possible d'en extraire quelques groupes contenant les protozoaires les plus préoccupants parmi les espèces parasites transmises par l'eau et les aliments, plus précisément :

- les Microsporidia avec les espèces du genre *Nosema* responsables de diarrhée chronique et de kératoconjonctivite plus particulièrement chez les sujets atteints du SIDA,
- les Rhizopoda (amibes) avec *Entamoeba histolytica*, responsable de la dysenterie amibienne, *Naegleria fowleri*, responsable de méningo-encéphalites primaires souvent mortelles, mais rares, et les espèces du genre *Acanthameba*, responsables d'encéphalite amibienne granulomateuse chez les sujets immunodéprimés et de lésions de l'œil chez les porteurs de lentilles,
- les Apicomplexa avec les espèces du genre *Cryptosporidium*, responsables de gastroentérites chez les sujets sains (maladie émergente aux Etats-Unis), mais également d'infections respiratoires et de la vésicule biliaire chez les sujets immunodéprimés, et du genre *Cyclospora*, également responsables de flambées récentes de gastro-entérites aux Etats-Unis,
- les Ciliophora (ciliés), avec *Balantidium coli*, responsable d'une forme grave mais rare de dysenterie,
- les Archaezoa, avec *Giardia lamblia*, responsable de gastroentérites (giardiasis) aux Etats-Unis et au Canada (fièvre du castor).

Les kystes de protozoaires résistent souvent à la désinfection et le sol peut en constituer un réservoir important. Ces kystes peuvent également renfermer des bactéries virulentes revivifiables.

### **Helminthes**

Les helminthes sont des eucaryotes métazoaires (plus communément, « animaux ») ayant la forme de vers ronds (Nématodes) ou de vers plats (plathelminthes) segmentés (Cestodes) ou non segmentés (Trématodes). Au stade adulte, ils peuvent parfois atteindre plusieurs mètres de long (jusqu'à 6 m pour *Taenia saginata*) mais leurs œufs, qui sont les principales formes de résistance, de transferts dans les milieux et de contamination sont microscopiques (20 à 100 µm), c'est pourquoi, ils restent dans la catégorie générique des « microorganismes ». Les helminthes présentent souvent des cycles vitaux complexes avec souvent plusieurs hôtes successifs : hôte(s) intermédiaire(s) et hôte final, au sein duquel s'accomplit la reproduction. Ils peuvent être ingérés par l'eau et les aliments ou encore pénétrer par eux même dans l'organisme à travers la peau (individus marchant pieds nus dans les rizières pour le *Shistosoma* responsable de la bilharziose)

Les populations des pays pauvres du sud paient encore un lourd tribut aux infections à helminthes (*Schistosoma*, ankylostomes, douves, filaires et autres), par contre dans les pays industrialisés, les espèces d'helminthes parasites du corps humain et préoccupantes pour la santé publique sont relativement peu nombreuses. En France il ne resterait que le *Taenia saginata* ou ténia du bœuf (Cestode) qui touche environ 0,5 % de la population en âge de manger de la viande (INERIS, 2001) et se retrouve dans la quasi-totalité des boues de station d'épuration (INERIS, 2007b) et quelques nématodes sans effet pathogène majeur (oxyures, etc.).

Les œufs de *Taenia saginata* sont rejetés dans les selles de l'homme contaminé (hôte final). Après contamination du sol par ces selles (par épandage de boues d'épuration, par exemple) les œufs peuvent être ingérés par les bovins (hôte intermédiaire) et se développent en larves qui s'enkystent, sous forme de cysticerques, dans la viande. Cette viande est ensuite ingérée par l'homme où les cysticerques se transforment en adultes qui se développent dans l'intestin grêle, s'y reproduisent (animaux hermaphrodites) et rejettent leurs œufs qui sont évacués avec les selles. Le ténia a un pouvoir pathogène limité : il absorbe les nutriments disponibles dans l'intestin grêle et peut provoquer ainsi l'amaigrissement et l'affaiblissement de l'hôte. Le ténia du porc (*Taenia solium*) présente une

morphologie et un cycle voisins de ceux du ténia de bœuf mais a pratiquement disparu d'Europe, du Canada et des Etats-Unis.

*Ascaris lumbricoïdes* (Nématode) est également pratiquement inexistant en France métropolitaine mais est encore présent dans les DOM-TOM et en Amérique du Nord. C'est apparemment le seul helminthe sur lequel une fonction dose-réponse a été établie (Navarro et al., 2009). L'ascaris adulte mesure 30 cm de long. Il vit et se reproduit (animal dioïque) dans l'intestin grêle de l'homme, du porc ou du cheval. Un fois ingérée, la larve d'ascaris se fixe au duodénum puis traverse la paroi intestinale pour pénétrer dans l'appareil circulatoire et circuler à travers les poumons et la trachée pour retourner dans le système digestif, tout en provoquant des réactions inflammatoires. La contamination se fait par ingestion de végétaux non lavés. Les effets de l'infection multiple à ascaris peuvent être assez graves : douleurs abdominales, vomissements, atteintes à la paroi abdominale, hémorragies.

### **Virus**

Les virus sont des entités infectieuses acellulaires constituées d'une coque protéique ou lipidique (capside) contenant le matériel génétique (de type ADN ou ARN). Incapables de synthétiser des protéines, les virus ne peuvent se reproduire qu'à l'intérieur d'une cellule vivante en lui faisant fabriquer leurs propres constituants après y avoir transféré leur propre acide nucléique viral : ce sont donc des parasites intracellulaires obligatoires. Après leur multiplication, les nouveaux virus sont libérés par lyse de la cellule hôte. Il existe des virus pour toutes les catégories d'être vivants, y compris les champignons et les bactéries (bactériophages). La plupart des virus ne peuvent s'attaquer qu'à certains types de cellules d'une espèce donnée. La taille des virus est comprise entre 20 et 1000 nm (0,02 et 1 µm). Une classification des virus (familles et genres) a été réalisée par comparaison du matériel génétique et secondairement, en fonction de leur écologie. Les virus s'attaquant aux cellules humaines et transmis par l'environnement sont principalement les entérovirus, pénétrant généralement par voie orale (contamination orale-fécale) et les virus respiratoires, pénétrant généralement par inhalation d'aérosols contaminés.

Les principaux virus transmis par l'eau et les aliments (transmission oro-fécale) sont :

- les entérovirus (virus à ARN), qui regroupent 70 genres dont les Poliovirus (agents de la poliomyélite), les Echovirus et les Coxsackiovirus,
- le virus de l'hépatite A (virus à ARN),
- le virus de l'hépatite E (virus à ARN),
- le virus de Norwalk ou norovirus (virus à ARN), responsable de 33 à 65 % des gastroentérites non bactériennes (INERIS, 2001),
- les adénovirus (virus à ADN) responsables de pathologies diverses (conjonctivites, gastroentérites, infections respiratoires) pouvant s'avérer mortelles chez les individus immunodéprimés.

Parmi les virus respiratoires, on peut citer les rhinovirus (virus à ARN, environ 100 genres), responsables des rhumes communs et l'Influenzavirus (virus à ARN) responsable de la grippe. Il faut noter que certains virus, dits oncogènes, peuvent favoriser le développement de tumeurs cancéreuses. Parmi les virus cités ci avant, seuls certains adénovirus sont actuellement considérés comme oncogènes.

### **Prions**

Les prions (*proteinaceous infectious particles*) sont des agents infectieux dépourvus de matériel génétique, appelés également agents non-conventionnels ou non-classiques. Il s'agit d'une protéine isoforme (même séquence d'acides aminés mais de structure spatiale différente) d'une protéine appelée PrP<sup>C</sup> (protéine du prion cellulaire), présente normalement dans la membrane du neurone chez l'individu sain. La forme anormale (pathogène) de la PrP, appelée PrP<sup>Sc</sup>, subsiste dans la cellule car elle est résistante à la protéinase K qui a pour fonction de détruire les protéines anormales et inutiles. Très rarement, la protéine normale PrP<sup>C</sup> change de conformation, aboutissant à la genèse du variant anormal pouvant se lier et convertir en cascade la protéine prion normale en variant anormal PrP<sup>Sc</sup>. Ces protéines PrP<sup>Sc</sup> s'agrègent entre elles dans le milieu extracellulaire, ce qui aboutit à la mort du neurone par apoptose (mort programmée). Les dépôts amyloïdes de PrP<sup>Sc</sup> sont responsables de la transmissivité potentielle de l'affection (Brigitte et Chrétien, 2005). Les prions sont responsables de maladies du cerveau, toujours mortelles, chez l'animal (Encéphalites spongiformes) et chez l'homme (maladie de Kreutzfeld-Jacob, syndrome de Gerstmann-Sträusler-Scheinker, kuru, insomnie familiale

fatale). Les protéines infectieuses montrent une résistance très élevée aux facteurs physiques (cuisson) et pourraient subsister dans le sol au sein d'organismes invertébrés (acariens). La transmission inter-espèce par voie orale (par exemple, viande de bœuf-homme) est considérée comme possible, d'où les destructions massives de cheptel suspect, notamment au Royaume-Uni, entreprises à la fin des années 90.

### ***Classification sanitaire des agents pathogènes***

Comme il existe des listes de substances toxiques répertoriées par les bases de données toxicologiques telles que HSDB (Hazardous Substances Data Bank) par exemple, des listes de microorganismes pathogènes connus ont été dressées, telle la liste figurant en Annexe III de la **Directive européenne 2000/54/CE concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition aux agents biologiques au travail**. Cette liste compte 349 agents biologiques dont 151 bactéries, 124 virus, 5 agents non classiques associés aux encéphalites spongiformes transmissibles (prions) et 69 parasites (dont 31 protozoaires et 38 helminthes). Cette liste européenne ne contient pas de champignons, ce qui n'est pas le cas de la liste « approuvée » plus complète des agents pathogènes publiée en 2004 par l'institution britannique HSE (Health and Safety Executive) qui contient près de 500 agents pathogènes (environ 160 bactéries, 165 virus, 6 agents non-conventionnels (protéines infectieuses), 30 champignons et 150 parasites).

La Directive européenne **2000/54/CE** établit un classement en *quatre groupes de risque selon l'importance du risque d'infection qu'ils présentent* (sic) :

- un agent du **groupe 1** n'est pas susceptible de provoquer une maladie chez l'homme
- un agent biologique du **groupe 2** peut provoquer une maladie chez l'homme et constituer un danger pour les travailleurs; sa propagation dans la collectivité est improbable; il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace
- un agent biologique du **groupe 3** peut provoquer une maladie grave chez l'homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs; il peut présenter un risque de propagation dans la collectivité, mais il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace
- un agent biologique du **groupe 4** provoque des maladies graves chez l'homme et constitue un danger sérieux pour les travailleurs; il peut présenter un risque élevé de propagation dans la collectivité; il n'existe généralement pas de prophylaxie ni de traitement efficace

En fait la liste d'agent de la Directive, comme celle publiée par HSE, précisent pour chaque agent, la classe de risque (2, 3 ou 4) et mentionnent également les informations suivantes :

- effets allergiques possibles (**A**)
- production de toxines (**T**)
- vaccin efficace disponible (**V**)
- liste des travailleurs exposés à cet agent à conserver pendant plus de 10 ans après la fin de leur dernière exposition connue (**D**)

Les critères utilisés par la Directive pour établir les différents groupes de pathogènes sont basés sur les nuisances potentielles des agents. Ces nuisances potentielles, ou encore pathogénicité, sont liées aux caractéristiques génétiques et phénotypiques des agents (le cas des prions mis à part), qui déterminent le caractère infectieux (**infectiosité** ou **infectivité**), c'est à dire la capacité de l'agent à se multiplier dans l'organisme hôte et la **virulence**, qui est la capacité à induire des effets pathogènes chez l'hôte infecté. Ces caractéristiques influent également fortement sur la survie et la multiplication des agents biologiques dans l'environnement (air, sol, eaux, aliments, etc.) et leur résistance à certains traitements (épuration des eaux usées, congélation, etc.).

Les mécanismes d'apparition des effets pathogènes sont variés (infectieux, toxi-infectieux, invasifs/non invasifs, immunitaires, etc.), mais sont également liés aux caractéristiques intrinsèques, génétiques et phénotypiques des agents. Cependant, ces caractéristiques intrinsèques des agents ne peuvent pas expliquer à elles seules la relation entre l'introduction physique d'agent dans un organisme hôte et l'apparition de la maladie. Des facteurs extrinsèques sont également impliqués en particulier, ceux liés à la matrice (aérosol, eau, sol, etc.) et ceux liés à l'hôte (populations cibles), ces facteurs seront étudiés dans les chapitres suivants.

### 2.3.2.2. Définition de l'effet sanitaire adverse (effet pathogène)

L'effet sanitaire adverse lié à un agent biologique est généralement consécutif non seulement à la pénétration mais également à la multiplication de cet agent au sein de l'organisme hôte (corps humain). Cette multiplication prend le nom générique d'infection, bien qu'il n'existe, selon l'OMS (2004), aucune définition universellement admise de ce terme. L'effet clinique, appelé généralement maladie, qui résulte de cette infection peut revêtir diverses formes (maux de tête, diarrhée, etc.), diverses durées (aiguë, subaiguë, chronique) et divers niveaux de gravité. Le terme gravité utilisé ici est également générique et rend compte de l'importance de l'impact de la maladie. Le mécanisme qui conduit de l'infection à la maladie symptomatique se compose d'une longue chaîne de réaction dont la séquence exacte et la probabilité de survenue ne sont pas toujours connues.

A l'échelle individuelle, la gravité de la maladie peut aller d'un niveau indétectable (infection asymptomatique) à un niveau extrême (mort) avec un ensemble de degrés intermédiaires : douleurs, nécessité d'hospitalisation, séquelles à long terme, etc.. Une même maladie (causée par un agent donné) peut présenter divers niveaux de gravité selon l'individu (cf. § 4.2.4).

A l'échelle collective (santé publique), l'impact (sévérité) de la maladie peut s'exprimer :

- en proportion de la population affectée sur une période donnée (incidence de morbidité ou de mortalité),
- en coût économique ou financier pour la société (prise en charge médicale, journées de travail perdues),
- en terme de qualité de vie, sous la forme d'indicateurs, comme ceux élaborés par l'OMS : Survie ajustée sur la qualité de vie (*Quality Adjusted Life Years* ou *QALYs*) ou Années de vie corrigées par le facteur d'invalidité (*Disability Adjusted Life Years* ou *DALYs*).

La notion de sévérité collective est surtout développée en matière de gestion du risque ou dans une démarche comparative, comme dans le cas d'une ERM semi-quantitative (cf. chapitre 2.2). En matière d'EQRM, la caractérisation du risque s'arrête le plus souvent au niveau de l'infection. Cependant, un niveau de gravité minimale est nécessaire à la connaissance de la fonction dose-réponse, la part de l'infection asymptomatique étant généralement difficile à établir.

### 2.3.2.3. Caractérisation de la matrice

La matrice est le milieu qui porte les agents pathogènes lors du contact de ceux-ci avec l'organisme hôte. Cette matrice peut être à l'état solide (viande, végétaux, fromages, boues séchées, compost, etc.), liquide (eau de boisson, lait, lisiers, boues liquides) ou encore dispersé dans l'air (aérosols). En fait, la distinction entre ces différents états n'est pas toujours nette pour certaines matrices hétérogènes telles que les boues liquides contenant une phase liquide et une phase solide, ou les aérosols constitués d'air et de particules liquides ou solides. Ces considérations sont cependant secondaires par rapport aux interactions entre la matrice, les agents pathogènes et les organismes hôtes, qui peuvent renseigner les questions suivantes :

- **voie d'exposition** préférentielle liée à la matrice. Il est évident qu'une matrice de type aliment favorisera l'ingestion orale et une matrice de type aérosol, l'inhalation. La matrice sol peut donner lieu à une exposition par contact cutané, par ingestion orale (l'ingestion de sol est une voie d'exposition relativement bien étudiée et quantifiée), et par inhalation, après remise en suspension des particules par le vent.
- **répartition spatiale des agents** (distribution) dans la matrice. Les matrices solides et semi-solides (aliments, boues) sont connues pour l'hétérogénéité de la répartition de leurs germes, avec des différences de plusieurs ordres de grandeur d'un échantillon à un autre. Par contre, les matrices totalement liquides (eau de boisson, lait) peuvent présenter une répartition relativement homogène des germes (distribution au hasard). Cette répartition homogène n'exclut pas la tendance à agrégation des germes que l'on observe souvent en phase aqueuse : ce sont les agrégats, et non les germes individuels, qui sont répartis de manière homogène.
- conditions de **survie** et éventuellement de **multiplication** des agents **dans la matrice**, en conditions naturelles ou au cours de différents traitements. En milieu sec et froid, les aérosols perdent rapidement les bactéries qu'ils portent à l'origine. Par contre, certains milieux tels que les boues ou les fèces animales peuvent être propices à la multiplication de germes

- pathogènes après rejet dans l'environnement. La multiplication de *Salmonella* spp. dans les boues après épandage est prise en compte dans certaines ERM (Gerba et al., 2008).
- possibilité de **transferts** des agents d'une matrice à une autre. Les aérosols sont par nature très propices à être transportés et peuvent se déposer sur le sol ou les végétaux et favoriser ainsi le transfert de certains germes (cf. chapitre 2.4).
  - influence de la matrice sur la **survie** et la **multiplication** des agents **dans l'organisme hôte**. Certaines matrices alimentaires à fort pouvoir tampon peuvent protéger les germes pathogènes contre l'action des acides gastriques ou des sels biliaires, ou accroître la tolérance des bactéries aux acides après une pré-exposition à des conditions modérément acides, ou en induisant une réaction de stress par privation dans le milieu.

#### 2.3.2.4. Caractérisation de la population à risque

Il est rappelé que ce rapport ne s'intéresse qu'à l'évaluation de risque microbien sur l'homme en tant que récepteur final. Cela n'exclut pas que l'animal peut intervenir comme hôte intermédiaire ou vecteur. Par contre, les approches visant exclusivement la santé des animaux domestiques ou sauvage ne seront pas traitées.

Certaines caractéristiques de la population humaine à risque (susceptible d'être exposée) peuvent influencer la sensibilité de cette population à un agent pathogène donné, soit au niveau de son infectiosité, soit au niveau de l'expression de la virulence de cet agent. L'accès des agents aux organismes hôtes est entravé par un certain nombre de barrières préexistantes, constituées d'un ensemble de facteurs plus ou moins efficaces selon les agents pathogènes. Les facteurs liés à l'hôte les plus souvent cités qui influencent l'expression du pouvoir pathogène des agents sont les suivants :

- L'âge
- L'état de santé général, de stress
- L'état immunitaire (notamment immunodépression acquise)
- Les conditions sous-jacentes, les infections simultanées ou récentes
- Le contexte génétique
- Les traitements médicamenteux
- Les interventions chirurgicales subies
- Un état de grossesse
- L'atteinte des barrières physiologiques
- L'état nutritionnel
- Les conditions démographiques, sociales et comportementales

La plupart de ces facteurs ne sont bien entendu pas indépendants les uns des autres. Ils ne sont pas non plus, dans leur totalité, pertinents pour l'ensemble des germes. Leur connaissance sera par contre essentielle à l'élaboration d'une ERM rigoureuse.

### 2.3.3. ESTIMATION DE L'EXPOSITION

#### 2.3.3.1. Voies d'exposition à prendre en compte

Les voies d'exposition pertinentes pour l'ERM sont l'ingestion orale, l'inhalation et la pénétration transcutanée.

L'**exposition par ingestion orale** est de très loin la voie la plus étudiée, notamment pour l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments et de l'eau de boisson. Ces aspects focalisent le plus grand nombre de travaux étant donnés les enjeux de santé publique qu'ils représentent y compris dans les pays industrialisés.

L'**exposition par inhalation** est essentiellement traitée pour les effets des endotoxines et des substances allergènes, dans le cadre de la santé professionnelle dans la filière déchet : ramassage, triage et surtout plateformes de compostage (cf. chapitre 2.7). En ce qui concerne les agents infectieux, l'exposition par inhalation a été prise en compte dans le cas de l'épandage de boues liquides (cf. chapitre 2.8), des établissements d'élevage, des silos à grains, de certaines industries agro-alimentaires et du textile et de celui du terrorisme biologique. Parmi les agents non infectieux, seules les endotoxines ont fait l'objet d'un modèle dose-réponse pour l'inhalation, qui est en fait un modèle pour un agent chimique. Une publication récente (US-EPA, 2008) affirme qu'aucun véritable modèle dose-réponse par inhalation n'a été élaboré pour un agent infectieux. En réalité, les ERM prenant en compte cette voie d'exposition pour les bactéries et les virus ont considéré qu'une partie (généralement 10 %) de la dose de microorganismes inhalée était ingérée après transport vers le tube digestif par l'escalator muco-ciliaire. Elles ont appliqué à cette fraction un modèle dose-réponse par ingestion orale (Tanner et al., 2008). Il existe cependant quelques rares exceptions telles que le coxsackievirus A21 (US-EPA, 2007) et le *Bacillus anthracis* (Bartrand et al., 2008) pour lesquels des modèles dose-réponse (respectivement exponentiel et Bêta-Poisson) ont été décrits exclusivement pour l'inhalation.

L'**exposition par contact cutané** peut s'avérer pertinente pour certaines toxines liposolubles, mais ne semble pas avoir fait l'objet de travaux particuliers. Le passage direct à travers la peau saine de certains parasites est connu, notamment dans les pays tropicaux pauvres (cas de l'agent de la schistosomiase), ce passage requiert d'ailleurs un contact prolongé de la peau avec l'eau ou un sol très humide. Le transfert à travers la peau par l'intermédiaire d'insectes vecteurs (moustiques, ou autres mouches piqueuses) de protozoaires et virus est également décrit depuis longtemps (paludisme, fièvre jaune, etc.) et connaît même un regain d'attention en Europe (importation de vecteurs tropicaux liées au réchauffement climatique). A ce propos il faut signaler que la mauvaise gestion des déchets, notamment au niveau domestique, peut favoriser la pullulation de certains de ces insectes (moustiques pondant dans les vieux pneus contenant de l'eau de pluie par exemple), notamment dans les zones chaudes (DOM-TOM). L'intervention d'un vecteur rend l'évaluation de risque très complexe et on lui préfère généralement des approches empiriques (politique d'éradication du vecteur, prophylaxie, etc.). En dehors des cas particuliers mentionnés ci avant, un agent infectieux ne peut pénétrer à travers la peau qu'au niveau d'une blessure ou d'une surface de peau abrasée, qui lui permet d'éviter la barrière cutanée. Lorsque ce risque est jugé significatif, il est généralement prévenu par des mesures de gestion adéquates telles que le port de gants, bottes ou autres. Il n'a pas été identifié de publication prenant en compte cette voie d'exposition dans le cadre d'une ERM.

### 2.3.3.2. Durée d'exposition

Dans le cas d'agents biochimiques, la prise en compte des expositions aiguë et chronique est pertinente, et les effets liés à ces deux durées d'exposition sont bien connus pour les endotoxines (INERIS, 2007a). Il est rappelé que pour les agents chimiques, l'exposition aiguë correspond à une durée inférieure à deux semaines (14 jours, d'après l'ATSDR), l'exposition subchronique à une durée allant de 2 semaines à 1 an, et l'exposition chronique correspond par convention à une durée supérieure à 1 an.

Dans le cadre d'une ERM liée à l'ingestion d'un microorganisme pathogène (bactérie, virus ou parasite), les modèles dose-réponse considèrent l'exposition comme un épisode instantané, et unique dans la période nécessaire à la survenue de l'infection. Si l'infection ne se produit pas, cela impliquera a priori que le pathogène n'aura pas survécu, ou en tout cas, ne se multipliera plus dans l'organisme hôte. Le risque d'infection est donc « remis à zéro » jusqu'au prochain événement d'ingestion d'un pathogène (repas, prise de boisson) qui sera considéré comme indépendant du précédent du point de vue probabilité. Cette démarche est cohérente si les événements à risque d'ingestion de pathogène sont suffisamment espacés dans le temps. Dans le cas d'une exposition par inhalation, la durée de l'épisode d'exposition peut être plus longue, par exemple 8 heures s'il s'agit d'une exposition professionnelle, voire chronique. L'exposition chronique à un agent infectieux est difficile à conceptualiser, si ce n'est par une longue série d'expositions indépendantes répétées. Dans ce cas, on peut intégrer la dose sur la durée de chaque épisode d'exposition, par exemple en multipliant la concentration du germe dans l'air par le volume inhalé ( $20 \text{ m}^3/\text{j}$  en moyenne).

D'autre part, l'exposition répétée, ou même unique, peut favoriser le développement chez l'hôte d'une immunité acquise à certains agents infectieux, ce qui est encore une spécificité de ce type d'agents face aux agents chimiques (OMS, 2004).

### 2.3.3.3. Identification et quantification de l'agent pathogène

A l'instar de l'évaluation de risque chimique, l'estimation de l'exposition repose sur la quantification de l'agent pathogène, qui se fait sur la base de concentrations, doses ou facteurs d'émission connus ou fixés normativement, ou sur des mesurages réalisés dans le cadre spécifique de l'étude. Les méthodes de quantification varient bien entendu selon la nature des agents.

Les agents biochimiques tels que les endotoxines, malgré leur nature, ne se mesurent pas structurellement comme les substances organiques habituelles (chromatographie, spectrométrie de masse, etc.) mais en fonction de leur activité biologique spécifique. Le test utilisé (LAL ou *Limulus Amoebocytes Lysate*) consiste à mettre en contact l'échantillon et de l'hémolymphe (sang) de Limule de l'Atlantique (*Limulus polyphemus*, arthropode marin). Les amoebocytes (équivalent des globules blancs) de l'hémolymphe de limule contiennent en grande quantité une protéine coagulante (lysate). En provoquant la lyse des amoebocytes, les endotoxines libèrent le lysate qui coagule l'hémolymphe. La réaction est très sensible et sa cinétique permet de doser l'endotoxine à l'aide d'un spectrophotomètre (cinétique chromogène) par comparaison à une courbe étalon. Cette méthode a fait l'objet d'une standardisation, notamment européenne. L'unité de mesure en est l'EU (*endotoxin unit*), il équivaut à 12 à 14 ng selon la bactérie Gram(-) qui produit l'endotoxine. Les substances telles que le bêta-(1-3)-glucane peuvent être dosées par des techniques similaires à celles utilisées pour les endotoxines ou plus spécifiquement par technique immuno-enzymatique (Rylander, 1999, Samadi et al., 2009).

Les techniques de détection et de quantification des agents biologiques, et notamment les apports des techniques moléculaires récentes, font l'objet d'un chapitre particulier (cf. chapitre 2.5). Il est rappelé que les unités classiques de dénombrement sont :

- pour les bactéries : l'UFC (unité formant colonie), qui comptabilise les bactéries viables
- pour les champignons : l'UFC ou le nombre de spores
- pour les virus : l'UFP (unité formant plaque)
- pour les parasites : le comptage directe des formes de transmission, à savoir kystes de protozoaires et œufs d'helminthes

Ces unités de dénombrement sont encore largement utilisées malgré le développement des nouvelles techniques de quantification, notamment celles basées sur l'amplification génique.

## 2.3.4. CONSTRUCTION DU MODÈLE DOSE-RÉPONSE

### 2.3.4.1. Données de base pour les relations dose-réponse

En première approche, les paramètres des relations dose-réponse s'établissent sur la base d'informations sanitaires existantes qui n'ont pas généralement été établies ou recueillies dans ce but. Aussi, l'évaluateur de risques se devra de bien vérifier les sources sollicitées et les protocoles employés pour juger de leur pertinence pour le travail qu'il a à accomplir. Plusieurs types d'informations utilisables existent, qui présentent chacun des avantages et des inconvénients, récapitulés dans le Tableau 2.3-1.

**Tableau 2.3-1 : Atouts et inconvénients des sources de données utilisables pour l'élaboration des modèles dose-réponse aux agents pathogènes**

Avantages	Limites – inconvénients potentiels
<i>Etudes épidémiologiques</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Montrent la totalité ou une grande partie du spectre clinique attribuable à un pathogène, y compris, lorsque la cohorte est suivie, des effets à long terme</li> <li>- Peuvent isoler des groupes particulièrement sensibles à l'action du pathogène</li> <li>- Permettent généralement d'identifier le média responsable (vecteur)</li> <li>- Permettent de remonter à la cause de la présence du pathogène dans le média d'exposition (aliment, par exemple) et aux circonstances écologiques (température, etc.) et/ou technologiques (panne de réfrigérateur, etc.) qui ont permis au pathogène de survivre et/ou se multiplier dans le média d'exposition ainsi que les comportements qui ont favorisé l'exposition (hygiène insuffisante, etc.)</li> <li>- Permettent parfois de connaître ou d'estimer des doses d'agents pathogènes administrées</li> <li>- Coût modéré</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La plupart des études sont lancées suite à des flambées de maladies, notamment de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) et visent principalement à identifier l'agent et la source de l'infection dans un but curatif et préventif, et de nombreuses données précieuses pour l'EQRM ne sont pas renseignées dans l'immédiat et deviennent ensuite très difficiles à récupérer (enquêtes incomplètes sur les sujets affectés, échantillons mal ou non conservés)</li> <li>- Les cas sont souvent définis sur la base de symptômes sans confirmation de la présence du germe responsable</li> <li>- Inclusion possible de maladies non spécifiques</li> <li>- L'intervention a posteriori ne permet généralement pas de connaître le nombre d'organismes viables (cas des protozoaires)</li> <li>- Taille totale de la population exposée parfois difficile à connaître</li> </ul>
<i>Etudes cliniques (exposition contrôlée de volontaires)</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Démontre clairement l'association entre la dose d'un agent clairement identifié et caractérisé, et la réponse de l'individu exposé</li> <li>- Peut être utilisé avec différentes matrices afin d'appréhender l'influence de celles-ci sur l'apparition des effets</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contraintes éthiques conduisant au choix d'individus adultes jeunes et en bonne santé (populations sensibles non étudiées) et d'agents pathogènes responsables de maladies relativement bénignes, ainsi que de faibles doses</li> <li>- Contraintes économiques limitant le nombre de doses testées</li> </ul>
<i>Données de surveillance et statistiques sanitaires</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mode de recueil des données standardisé et rigoureux</li> <li>- Permet d'évaluer l'incidence sur la population totale d'une région/d'un pays sur une longue période</li> <li>- Les données peuvent être rapprochées de données d'exposition (études de consommation) pour établir ou valider un modèle dose-réponse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ne concernent généralement que les maladies donnant lieu à consultations médicales ou hospitalisation (biais de caractérisation possible par surreprésentation des cas les plus graves)</li> <li>- Absence de données étiologiques associées aux données sanitaires</li> </ul>
<i>Etudes animales</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coûts et contraintes éthiques moins élevés que les études cliniques, permettant de multiplier les sujets, les répétitions, les vecteurs et les niveaux d'exposition</li> <li>- Meilleur contrôle de l'exposition que dans les études cliniques</li> <li>- Possibilité de travailler avec ses sous-populations sensibles (animaux immunodéprimés, etc.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Difficultés d'extrapolation des modèles animaux aux modèles humains, les animaux les plus proches de l'homme du point de vue toxicologique (singe, cochon) présentant des contraintes éthiques et des coûts élevés</li> <li>- Faible variabilité génétique</li> </ul>
<i>Etudes d'intervention (essais sur l'humain avec réduction de l'exposition chez un échantillon de population)</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Etude sur des populations réelles, présentant la même variabilité que la population générale</li> <li>- Permet de mettre en évidence les effets d'expositions répétées à des niveaux de pathogènes et des conditions d'exposition réalistes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ne permet pas d'augmenter l'exposition au dessus du niveau normal (groupe témoin)</li> <li>- Effets généralement très modérés, dont la mise en évidence nécessite des tests très sensibles</li> </ul>

Cependant, les informations passées en revue dans le Tableau 2.3-1 ne renseignent le plus souvent que sur la relation entre une dose d'exposition et l'incidence d'une maladie clinique identifiable, dont on sait qu'elle ne représente qu'une partie, généralement inconnue de l'incidence de l'infection. Le recours à la modélisation qui retranscrit de manière mathématique les différentes étapes qui conduisent à l'infection et, éventuellement, à la maladie, est fréquemment mis en œuvre, avec l'utilisation des données sanitaires réelles pour calibrer et/ou valider les paramètres.



### 2.3.4.2. Modélisation de la fonction dose-réponse

#### **Hypothèses de base**

La modélisation de la fonction dose-réponse a surtout été développée pour la fonction dose-infection. En effet la fonction infection-maladie est généralement réduite à une stratification de la population cible en catégories de vulnérabilité avec une probabilité constante dans chaque catégorie de développer la maladie après infection. Il en va de même pour la probabilité que le développement d'une maladie donnée aboutisse à des séquelles à long terme ou à la mortalité.

La modélisation du risque d'infection repose sur deux hypothèses fondamentales répondant aux questions suivantes :

- les mécanismes d'infection sont-ils avec ou sans seuil ?
- les actions des agents infectieux d'un même inoculum sont-elles indépendantes ou synergiques ?

Les mécanismes d'effets avec ou sans seuil de dose coexistent dans l'évaluation de risque chimique, généralement appliqués respectivement aux substances non cancérigènes (quotient de danger) et cancérigènes (excès de risque unitaire). Dans l'approche ERM actuelle, les mécanismes d'infection sont considérés **sans seuil**, en raison des arguments suivants (OMS 2004) :

- bien que le concept de dose infectante minimale ait été largement développé, il n'a jamais été établi scientifiquement des seuils de doses microbiennes sous lesquels aucune réponse ne se produit jamais
- chaque microorganisme pathogène ayant la possibilité de se multiplier dans un hôte, une infection peut résulter de la survie d'un seul microorganisme viable. Ce principe s'énonce dans le concept du choc unique (*single hit* en anglais) qui se rapproche des modèles « one hit » et apparentés, utilisés pour la caractérisation du risque cancérigène. En conséquence, même si la dose est très faible, il y a toujours une probabilité (non nulle) d'infection et de maladie, et cette probabilité augmente avec la dose.

L'inconvénient des modèles sans seuil est qu'ils ne peuvent être calés que sur des observations de réponses liées à des doses plus ou moins importantes (ou tout au moins, observables), ce qui rend l'extrapolation aux faibles doses porteuses d'incertitudes notables (OMS, 2009).

Les résultats des études supportent le plus souvent l'hypothèse d'une **action indépendante** des microorganismes infectieux, c'est-à-dire que ces derniers ne combinent pas leur action pour augmenter, avec leur nombre, la probabilité de l'infection. Cependant, des recherches récentes ont montré que l'expression génétique de la virulence de certaines bactéries ne serait possible que quand ces bactéries ont atteint une certaine densité. Ce phénomène appelé « *quorum sensing* » fait intervenir les modes de communication entre cellules bactériennes : excrétion de petites molécules diffusant dans le milieu, qui, au-dessus d'une concentration critique constituent un complexe activateur de la transcription de gènes inducteurs de virulence (production de toxines, etc.). Cependant, il n'est pas évident que le quorum sensing intervienne au stade précoce de l'infection et compromette l'hypothèse de l'action indépendante.

#### **Choix du modèle dose-infection**

Il faut rappeler la subsistance de modèles empiriques reposant sur l'existence d'un seuil décrit généralement par la dose minimale infectante (DMI). Ces modèles empiriques reposent sur la variabilité du seuil parmi les individus, chaque individu ayant sa propre dose minimale infectante ou seuil de tolérance à l'infection. Les modèles les plus fréquents considèrent que le seuil de tolérance suit une distribution log-normale. Dans le domaine de la qualité des aliments et eaux de boisson, une approche pragmatique pourrait consister à prendre comme valeur toxicologique de référence le seuil réglementaire de concentration en pathogènes d'un aliment ou d'une eau potable. Il s'agirait alors d'évaluer le risque de dépassement de ce seuil qui entraînerait donc la non autorisation de consommation du produit, après dilution, croissance ou décroissance de l'inoculum contaminant.

Avec l'abandon de l'hypothèse d'existence d'un seuil, ces modèles sont de moins en moins utilisés et ne sont plus cités dans les publications récentes de l'OMS (WHO, 2009b). Cependant, l'absence de

seuil rend difficile une approche normative, ce que regrettent certaines institutions, telles que l'US-EPA, notamment dans la perspective de la lutte contre le bioterrorisme (US-EPA, 2007).

Il faut noter que, dans le cas de l'ERM, l'existence d'un seuil n'évite pas de prendre en compte sa distribution parmi la population sous forme modélisée. Cette démarche est différente de celle adoptée en matière de risque chimique où la détermination de la valeur toxicologique de référence (VTR) d'une substance à seuil d'effet recourt à l'introduction d'un facteur d'incertitude censé prendre en compte toute l'étendue de la variabilité humaine. Ce facteur d'incertitude est généralement égal à 10. Ainsi, si la VTR d'une substance prend la valeur V pour une catégorie relativement protégée de la population (adultes sains, par exemple), la VTR sera égale à V/10 pour la population générale.

Dans le cas de l'approche sans seuil, le risque d'infection dépend de deux probabilités : la probabilité qu'un agent infectieux soit absorbé, c'est-à-dire pénètre dans l'organisme hôte (par ingestion, inhalation ou pénétration transcutanée) et la probabilité qu'il survive et se développe une fois dans l'organisme.

Selon l'hypothèse du choc unique, un germe absorbé par un hôte présente une probabilité  $p_m$  d'y survivre et de s'y développer. La probabilité pour l'hôte de ne pas être infecté sera donc de  $(1 - p_m)$ . Si une dose de  $n$  germes ont pénétré dans le même organisme et que l'on considère leurs actions comme indépendantes, la probabilité pour l'hôte de ne pas être infecté sera de  $(1 - p_m)^n$  et par conséquent, la probabilité d'infection de l'hôte sera :

$$P_{inf} = 1 - (1 - p_m)^n$$

A partir de cette hypothèse, un ensemble de modèles dits « du choc unique » peuvent être constitués en fonction d'hypothèses concernant d'une part la distribution des pathogènes dans l'inoculum, et d'autre part la distribution de la valeur de  $p_m$ . Deux principaux modèles mécanistes de ce type sont utilisés en EQRM : le modèle exponentiel et le modèle Bêta-Poisson.

Pour ces deux modèles, la dose absorbée (quantité d'agents viables pénétrant dans l'organisme) est considérée suivre une distribution de Poisson de moyenne  $D$ , c'est-à-dire que les agents présents dans le média d'exposition, avec une concentration moyenne  $D$ , se répartissent au hasard dans les parcelles de milieu ingérées ou inhalées par l'hôte.

Dans le cas du **modèle exponentiel**, les agents infectieux absorbés ont la même probabilité de causer l'infection, c'est-à-dire que la probabilité  $p_m$  prend une valeur constante, désignée par  $r$ . Dans ce cas, la probabilité d'infection est estimée par la fonction

$$P_{inf} = 1 - e^{-rD}$$

avec  $P_{inf}$  : probabilité d'infection  
 $r$  : probabilité pour l'agent de causer l'infection (souvent formulé en valeur inverse :  $1/r$ )  
 $D$  : dose (quantité d'agents viables absorbée)

Dans le cas du **modèle Bêta-Poisson**, il est considéré que l'interaction entre agent infectieux et l'hôte est hétérogène et la probabilité d'infection  $p_m$  suit une distribution de type bêta. Dans ce cas, la probabilité d'infection est estimée par la fonction :

$$P_{inf} = 1 - (1 + D/\beta)^\alpha$$

avec  $P_{inf}$  : probabilité d'infection  
 $D$  : dose (quantité d'agents viables absorbée)  
 $\alpha$  et  $\beta$  : paramètres du modèle, le modèle est valide si  $\beta \geq 1$  et  $\alpha \geq \beta$

le modèle de Bêta-Poisson peut également être caractérisé par la valeur  $N_{50}$ , du nombre de germes viables provoquant une infection chez 50 % de la population :

$$N_{50} = \beta / (2^{1/\alpha} - 1) = DI_{50}$$

Si la virulence du germe et la létalité de la maladie sont connues, le  $N_{50}$  peut être converti en  $LD_{50}$  (dose létale pour 50% de la population)

Au cours des 15 dernières années, ces modèles ont été développés pour de nombreux agents infectieux, dont les exemples applicables à la problématique déchets, seront présentés ultérieurement cf. chapitres 2.7 et 2.8). Sans qu'il y ait de règle absolue, le modèle exponentiel semble le mieux ajusté aux données concernant les infections à virus et à protozoaires, alors que le modèle Bêta-Poisson semble mieux décrire les risques d'infections bactériennes. Il faut noter que ces modèles utilisent une extrapolation linéaire aux faibles doses.

Le Tableau 2.3-2 donne des exemples de relations dose-réponse de type Bêta-Poisson en présentant notamment les paramètres retenus par l'INERIS pour son évaluation de risque associé à l'utilisation agricole de boue de station d'épuration (INERIS, 2007b).

**Tableau 2.3-2** : Exemples de relations dose-réponse d'agents biologiques cités dans la littérature

Agent pathogène	Modèle	$\alpha$	$\beta$	r	Référence
Enterovirus	Bêta-Poisson	0,42	- 0,26	s.o.	INERIS, 2007b
Coxsackievirus	Exponentiel	sans objet	s.o.	1/39,4	Brooks et al, 2005a
<i>Salomonella non typhi</i>	Bêta-Poisson	51,45	- 0,1324	s.o.	INERIS, 2007b
<i>E. coli</i> 0157 :H7	Bêta-Poisson	1,001	-0,005	s.o.	INERIS, 2007b
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Exponentiel	s.o.	s.o.	1/238	INERIS, 2007b
<i>Ascaris lumbricoïdes</i>	Bêta-Poisson	0,104	0,044	s.o.	Navarro et al., 2009

#### **Ajustement des modèles aux données sanitaires**

Sans vouloir entrer dans le détail des analyses statistiques, les méthodes basées sur la fonction de vraisemblance sont les plus utilisées, aussi bien pour ajuster les paramètres d'un modèle aux données réelles fournies par les informations/études sanitaires (voir Tableau 2.3-1), que pour comparer les modèles entre eux (par exemple exponentiel et Bêta-Poisson). La fonction de vraisemblance d'une série d'observations est construite pour l'ensemble des doses  $D_i$ , des nombres de sujets d'exposés  $n_i$  et de sujets infectés  $k_i$ , avec le vecteur paramètre  $\theta$  de la fonction dose-réponse  $f(D,\theta)$ . L'ajustement consiste à trouver, à l'aide de logiciels statistiques, la valeur de  $\theta$  qui maximise la fonction de vraisemblance, c'est-à-dire qui présente le maximum de vraisemblance. La vraisemblance est maximisée lorsque la déviance ( $Y = -2 \times \log$ -vraisemblance) est minimisée. L'ajustement est considéré acceptable lorsque la déviance minimum ( $Y_{min}$ ) est inférieure à la valeur du Chi2 à k-j degrés de liberté, k étant le nombre de doses et j le nombre de paramètres du modèle (Navarro et al., 2009).

### **2.3.5. CARACTÉRISATION DU RISQUE**

Lorsque le modèle dose-réponse a été validé, l'évaluateur est en mesure de présenter les risques d'infection liés aux situations et aux pathogènes étudiés. Le risque d'infection peut être éventuellement traduit en risque de maladie, de mortalité, ou en risque socio-économique pour les populations cibles si les données disponibles le permettent (cf. chapitre 2.3).

La prise en compte de la **variabilité** et de l'**incertitude** est souvent oubliée dans l'évaluation de risque chimique où l'on se contente souvent d'appliquer le principe de prudence. Ces notions ne peuvent par contre être occultées dans l'ERM eu égard à la variabilité et la complexité des phénomènes biologiques et au caractère discret de certaines variables tels que les doses d'agents infectieux, alors que les doses d'agents chimiques, même faibles, impliquent des nombres très élevés de molécules.

Aussi, les résultats d'ERM sont souvent présentés sous forme de faisceau de courbes, nuages de points ou valeurs incluses dans des intervalles de confiance. Pour ce faire, le recours aux techniques de simulation de Monte Carlo est à présent quasi systématique. Cette méthode considère chaque valeur possible d'une variable et la probabilité que cette valeur soit prise par la variable, définie par sa distribution de probabilité, autrement dit, la valeur prise par la variable est un échantillon tiré dans sa distribution de probabilité. Lorsque la construction d'un modèle met en jeu une série de paramètres présentant chacun une distribution de probabilité, le calcul de la distribution finale des résultats du modèle par une méthode mathématique classique serait fastidieux. L'approche de Monte Carlo consiste à faire faire par un logiciel un échantillonnage aléatoire de chaque distribution de probabilité impliquée dans le modèle. En réalisant un très grand nombre d'itérations (en général 10 000), on génère une distribution finale du risque calculé par le modèle intégrant les sources de variation et d'incertitude rencontrées dans le processus (WHO, 2009b).

En cas de **multi-infections** (multiplication simultanée de plusieurs germes infectieux dans l'hôte), les interactions entre les effets pathogènes sont souvent mal connues, à l'exception des synergies entre germes favorisant l'immunodépression (VIH) et les germes dits opportunistes (*Pneumocystis spp.*, *Cryptosporidium spp.*, etc.). On peut également supposer que les effets s'ajoutent si les organes cibles des infections sont différents.

La possibilité de **transmission secondaire** entre une personne infectée et une personne saine doit également être prise en compte dans la caractérisation du risque. Pour les maladies à transmission orale, le risque de transmission secondaire est très faible lorsque les conditions générales d'hygiène sont bien développées, comme c'est le cas général des pays riches. Ce risque est plus élevé pour les maladies à transmission aérienne (OMS, 2004).

Lorsque l'exposition à des agents infectieux est concomitante d'exposition à des agents chimiques ou biochimiques les **interactions** possibles doivent également être évaluées : il est concevable qu'une substance irritante favorise l'installation d'un virus ou d'une bactérie, notamment dans les voies respiratoires. Parmi les exemples classiques, les infections microbiennes (broncho-pneumonies) ont été la cause majeure des milliers de morts causés par l'épisode de pollution atmosphérique appelé « grand smog » à Londres en décembre 1952. Plus en relation avec la problématique ERM, les endotoxines sont connues pour interagir avec les substances allergènes et les particules pour générer ou exacerber des maladies respiratoires et des effets systémiques (NRC, 2002).

Il n'existe pas à notre connaissance des **critères consensuels de décision** pour le risque microbiologique comme il en existe en matière de risque chimique (Quotient de Danger < 1 et Excès de Risque Individuel <  $10^{-5}$ ). Le risque de  $10^{-4}$  infection par personne et par an a été proposé pour l'eau de boisson aux Etats-Unis, mais jugé irréaliste face aux données épidémiologiques nationales : en 1998-1999, l'incidence des maladies gastro-intestinales aiguës aurait été d'après le CDC (Center for Disease Control, Atlanta) de 0,72 maladie/personne/an, dont le tiers (0,26) serait lié à l'eau de boisson (Soller, 2006).

## **2.4. TRANSFERT ET SURVIE DES GERMES DANS LES DIFFÉRENTS COMPARTIMENTS ENVIRONNEMENTAUX**

Dans le cadre de cette étude, la notion de transfert d'agents pathogènes comprend d'une part l'émission de l'agent à partir d'une source donnée (par exemple, andain de compost, boue épandue) vers un compartiment environnemental, sa survie, son déplacement et éventuellement sa multiplication au sein de ce compartiment, puis l'émission de ce compartiment vers un autre jusqu'à la porte d'entrée dans l'organisme par alimentation, ingestion ou contact cutané.

### **2.4.1. TRANSFERTS DES AGENTS INFECTIEUX DES DÉCHETS VERS L'AIR**

Les agents infectieux (bactéries, virus, parasites) sont émis et transportés dans l'air sous forme de particules en suspension composées soit d'agents individuels (corps bactériens, spores), soit d'agents agglomérés, soit d'agents fixés sur des particules minérales (sol) ou organiques (fins débris végétaux) ou encore contenus dans des particules liquides (embruns). Les spores de certains champignons sont connues pour être émises dans l'air de manière balistique (exemple, genre *Pilobolus*, coprophile mais non pathogène pour l'homme). Dans des conditions de vents faibles à moyens, seules les particules les plus fines peuvent se déplacer sur de longues distances.

Les mesures d'émission aériennes portent généralement sur les PM<sub>10</sub>, c'est-à-dire les particules de diamètre aérodynamique inférieur à 10 µm. Ces dimensions sont cohérentes avec celles des corps bactériens (2 à 6 µm x 0,5 à 2 µm) et des spores de champignons (autour de 4 µm). Les oocystes de protozoaires sont par contre à la limite de ces dimensions : 2 à 6 µm pour *Cryptosporidium parvum* et 9 à 15 µm pour *Giardia lamblia* (Pachepsky et al., 2006). Les œufs d'helminthes, de tailles comprises entre 20 et 100 µm, sont très peu concernés par le transport dans l'air.

Les émissions atmosphériques d'agents pathogènes à partir de déchets solides s'observent principalement au niveau des sites de compostage. Bien entendu la collecte, le tri et la mise en dépôts de déchets dans les centres d'enfouissement provoquent la mise en suspension de particules dans l'air susceptibles de contenir des agents pathogènes mais à une échelle jugée quantitativement réduite et qui ne peut affecter que le personnel directement en contact avec les déchets. De nombreuses études relatent les effets respiratoires ressentis par les employés des centres de tri, mais cette activité se déroule dans des espaces fermés où les émissions atmosphériques vers le milieu extérieur sont en principe abattues (biofiltre, etc.).

Parmi les activités de compostage, celles qui émettent le plus de particules sont le déchiquetage, le tamisage et le retournement. Les émissions sont bien entendu favorisées par une vitesse de vent élevée, et une faible humidité de l'air (Stagg et al., 2010). La durée de maintien des particules dans l'air est également liée à leur dimension, aux vents et autres courants atmosphériques. Les particules supérieures à 2 µm peuvent demeurer en suspension dans l'air de quelques heures à quelques jours.

Les niveaux de fond de bactéries et de champignons sont généralement d'environ 1000 UFC/m<sup>3</sup>. A toute proximité des activités d'émissions importantes du site de compostage, les concentrations en bactéries et champignons, prises à hauteur d'homme (1,50 m), peuvent dépasser 1 million UFC/m<sup>3</sup>. Ces comptages diminuent rapidement lorsqu'on s'éloigne, sous le vent de ces activités, pour se rapprocher des niveaux de fond à partir d'une distance de 50 à 200 m (Stagg et al., 2010).

La brièveté du transfert aérien réduit quelque peu l'intérêt d'une étude de la survie des bactéries dans l'air. Aucune étude n'a été identifiée caractérisant la durée de vie dans l'air des bactéries issues des déchets mais les échantillonnages d'aérosols à plusieurs centaines de mètres sous le vent des sites de compostage confirment qu'une partie d'entre elles survivent et restent cultivables à cette distance (Stagg et al., 2010). La survie des bactéries est influencée par l'humidité de l'air (favorable) et les radiations UV (défavorable). Les formes de résistance telles que les spores de champignons sont également sensibles à ces facteurs même si elles sont en principe capables de survivre plus longtemps. Les virus ne sont pas pris en compte dans les aérosols de composts car ils sont considérés comme totalement éliminés par les hautes températures générées par le processus de compostage.

L'épandage de boues de STEP sur le sol peut également être à l'origine d'une émission des agents pathogènes dans l'air soit par aérosolisation de boues liquides pendant leur épandages, soit par remise en suspension dans l'air de sols fraîchement amendés par des boues liquides ou solides. L'aérosolisation des boues pendant l'application dépend de la technique employée et de la siccité des boues : des boues liquides épandues par asperseur émettent un plus grand nombre de germes dans l'atmosphère, mais de manière très fugace. Dans des conditions normales, la zone d'influence reste limitée à quelques mètres autour du point d'épandage et le risque généré concernent essentiellement l'opérateur d'épandage (Tanner et al., 2008). La répartition des germes dans la fraction aérosolisée n'est pas forcément identique à celle de la matrice originale. Ainsi, une étude a montré que les virus les plus susceptibles d'être aérosolisés étaient ceux contenu par la phase liquide de la boue et non ceux adhérant à la phase solide (Brooks et al., 2005a). La dispersion d'aérosols au-delà des limites des parcelles d'épandage peut être montrée par l'identification puis la détection par traçage génétique (*Microbial Source Tracking*) de germes spécifiques aux boues épandues et absents du sol avant traitement (Baertsch et al., 2007).

La remise en suspension de sol amendé par des boues nécessite une vitesse de vent relativement élevée, et peut être estimée quantitativement par des équations appliquées à l'érosion éolienne des sols qui fait intervenir de nombreux facteurs tels que l'humidité du sol, la densité et la nature couverture végétale, la rugosité du terrain, etc.. Cette équation renseigne sur la perte de sol superficiel mais pas sur la distance parcourue par les particules et donc les potentialités de contamination de zones situées au-delà du périmètre amendé. Ce type de contamination potentielle ne semble pas particulièrement ciblé par les études qui se concentrent surtout sur l'aérosolisation des boues pendant l'application (Brooks et al., 2005a, Brooks et al., 2005b). La durée de vie relativement courte des germes pathogènes (bactéries, protozoaires et virus) à la surface du sol limite vraisemblablement fortement les risques liés à l'érosion éolienne.

La dispersion atmosphérique des aérosols émis par les activités de compostage ou d'épandage de boue, assimilés à des particules fines (PM<sub>10</sub>), peut être simulée par les logiciels habituels de modélisation de dispersion atmosphérique. Les modèles cités sont de type déterministe (modèle gaussiens) de première ou de seconde génération (ADMS, par exemple). Les types de sources à introduire dans le modèle sont de type ponctuel (tas de compost, poste de tamisage, épandeur de boue) ou surfacique (surface de sol amendés) (Stagg et al., 2010).

Les stations d'épuration peuvent également engendrer, des émissions de fine gouttelettes d'eau usée dans l'atmosphère, notamment au niveau des dispositifs d'aération (boues activées, chenaux d'oxydation, etc.) (Fannin et al., 1985).

#### **2.4.2. TRANSFERT DES AGENTS INFECTIEUX VERS LE SOL, LES EAUX SOUTERRAINES ET SUPERFICIELLES**

Le transfert des germes pathogènes associés aux déchets vers le sol se fait, soit par déposition des aérosols décrits précédemment, soit par épandage de boue, cette dernière activité entraînant, de loin, le dépôt du plus grand nombre de germes pathogènes de toutes catégories. Il faut noter que l'épandage de boues, liquides ou solides, peut se faire en surface ou directement à une certaine profondeur, le sol ayant été préalablement travaillé par des disques.

La durée de vie des germes dans le sol dépend des espèces, du mode de dépôt et également de la matrice dans laquelle les germes peuvent subsister et qui dans certains cas (boues solides) ne s'incorporent au sol qu'après une homogénéisation anthropique (labour ou autre travail du sol) et/ou naturelle (rôle prépondérant de la mésofaune).

Une publication (Gerba and Smith, 2005), reprise par l'US-EPA (US-EPA, 2008) fournit les valeurs maximales suivantes de durée de vie dans le sol des différentes catégories d'agents pathogènes :

- bactéries : 2 mois (maximum général) à 1 an (maximum absolu)
- virus : 3 mois (maximum général) à 6 mois (maximum absolu)
- protozoaires : 2 jours (maximum général) à 10 jours (maximum absolu)
- helminthes : 2 ans (maximum général) à 7 ans (maximum absolu)

Ces valeurs sont bien entendu variables d'une espèce/souche à l'autre et selon les conditions abiotiques (sol et climat) et biotiques (écologie microbienne). La survie des bactéries dépend également de leur faculté à produire des formes de résistances, mais celle-ci (endospores) sont particulièrement l'apanage des bactéries Gram(+), qui ne comptent pas parmi les pathogènes les plus fréquemment associés aux déchets (les actinomycètes sont très fréquents dans les composts mais peu pathogènes). Les oocyste de protozoaires peuvent subir des attaques bactériennes au sein du sol. Une autre publication (US-EPA, 2005) donne une durée de vie moyenne dans le sol d'un mois pour *Cryptosporidium* et 2 semaines pour *Giardia*, à des températures comprises entre 20 et 29 °C. La survie des champignons (moisissures) portés par les déchets dans le sol semble susciter peu d'intérêt pour les chercheurs, vraisemblablement par le fait que leur caractère pathogène se manifeste essentiellement après inhalation. La très longue survie (plusieurs années) dans le sol des œufs d'helminthes, très résistants grâce à leur coquille à 3 ou 4 couches (lipidique, chitineuse et protéique), est connue depuis longtemps (Jimenez, 2007).

Une fois au contact du sol, les germes pathogènes peuvent subir, sous l'action des eaux pluviales, des transports verticaux et horizontaux. Le transport vertical se fait par entraînement des eaux pluviales dans un sol relativement perméable. La vitesse de percolation est essentiellement liée à la porosité du sol, avec une vitesse beaucoup plus grande sur les sols sableux que sur les sols argileux, et à la taille des microorganismes : en principe, plus l'organisme est petit, comme par exemple un virus, plus il a de chance de migrer rapidement. Des phénomènes d'adhérence avec les particules fines du sol (argiles et limons) et le complexe organo-minéral peuvent également intervenir.

A ces obstacles physiques s'ajoutent les obstacles écologiques. Le sol présente en effet une très abondante microflore et microfaune qui concurrence sévèrement, voire exerce une prédation directe sur les germes allochtones introduits. Cela explique le pouvoir épurateur du sol qui protège les nappes phréatiques des contaminations et est même valorisé directement pour traiter les eaux usées dans certains endroits (par exemple, à Agadir, au Maroc). Logiquement, une matrice liquide va favoriser la percolation des germes : une étude a montré que *E. coli* O157:H7 et *Salmonella enterica* var. Typhimurium migraient plus rapidement et survivaient plus longtemps dans le sol lorsqu'ils étaient

apportés dans du lisier que dans du fumier. La même étude ne montre pas de croissance de ces bactéries dans la rhizosphère des végétaux cultivés (laitues) (Semenov et al., 2009).

Les barrières physiques et biologiques sont telles que la contamination de nappes phréatiques par les germes pathogènes apportés par l'épandage de boue est considérée comme très limitée et peu préoccupante (US-EPA, 2008). Aux Etats-Unis, une étude a néanmoins été lancée concernant la migration des virus contenus dans les boues vers les eaux souterraines (US-EPA, 2008).

Lorsque que la pluie est trop importante pour être totalement infiltrée dans le sol, elle ruisselle à la surface du sol et en arrache les particules avec une force d'autant plus grande que la pente est forte. Les pathogènes présents à la surface du sol après un épandage de boue subissent ainsi un déplacement horizontal qui se termine finalement dans un cours d'eau ou un point d'eaux superficielles. Ce transport est modélisable à l'échelle d'un bassin versant (Pachepsky et al., 2006), mais cette approche spatiale est généralement restreinte aux pathogènes apportés par l'épandage de produits d'élevage (fumier). Une expérimentation en casier et pluie simulée a montré que des bandes enherbées placées perpendiculairement à la pente, qui ralentissent l'écoulement et favorisent l'infiltration, peuvent diminuer de 1 à 3 log le flux d'oocystes de *Cryptosporidium parvum* (Atwill et al., 2002).

### 2.4.3. TRANSFERT DES AGENTS INFECTIEUX À LA SURFACE ET À L'INTÉRIEUR DES VÉGÉTAUX CULTIVÉS

Dans les années 1990-2000, une série d'épisodes de toxi-infection alimentaire liés à la consommation de légumes et de fruits crus a été observée au Etats-Unis et a incité les microbiologistes et agronomes à se pencher sur l'étude des facteurs favorisant l'adhésion, voire la colonisation des surfaces des végétaux par les bactéries pathogènes pour l'homme. Les études antérieures consacrées aux bactéries phytopathogènes ou symbiotiques des végétaux ont montré que la colonisation des plantes par les bactéries est un processus en trois étapes (Ukuku et al., 2005) :

- 1) adhésion réversible : à ce stade, la distance entre la bactérie et la surface du végétal est supérieure à 50 nm et l'adhésion est assurée par des liaisons de Van der Waals de faible intensité. La bactérie peut donc être facilement éliminée par lavage à l'eau (par la pluie, par exemple).
- 2) adhésion primaire : la distance entre la bactérie et le substrat est comprise entre 10 et 20 nm et les forces électrostatiques interviennent et augmentent l'attraction entre le germe et le substrat (à moins que celui-ci ne présente une charge nette de surface). Si la distance est inférieure à 1 nm, d'autres forces, plus intenses, peuvent intervenir entre la surface du végétal et du corps bactérien telles que les liaisons hydrogène, les ponts cationiques ou encore des interactions ligand-récepteur. A ce stade, les bactéries deviennent très difficiles à éliminer de la surface du végétal.
- 3) colonisation : multiplication de la bactérie à la surface du végétal qui peut s'accompagner de la formation d'un biofilm, c'est-à-dire d'une communauté structurée de bactéries enfermées dans une matrice de polymères qu'elles secrètent elles-mêmes et matrice adhérente à une structure inerte ou vivante, en l'occurrence la surface du végétal.

Les *Salmonella* et autres Enterobacteriaceae, dont *E. coli*, forment à la surface des plantes des biofilms dont la matrice est constituée de curli (polymères fibreux de nature protéinique) et de cellulose. Cette matrice hydrophobe maintient les bactéries fortement agglomérées à la surface des végétaux, en particulier quand cette surface est rugueuse ou crevassée comme dans le cas des melons cantaloups. Pour les fruits à surface lisse (pommes par exemple), l'adhésion des bactéries se fera préférentiellement au niveau du pédoncule ou du calice. D'autres substances ou mécanismes peuvent intervenir dans l'adhésion des bactéries aux plantes. Parmi les bactéries pathogènes susceptibles d'adhérer aux végétaux, on compte *Salmonella enterica* var. Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *E. coli* O57:H7. La force de l'attachement augmente donc avec le temps écoulé depuis la contamination, ce qui diminue progressivement l'efficacité des lavages et traitements désinfectants. Ainsi, après un contact de 24 heures, il a été montré que l'élimination des bactéries par utilisation de produit chloré ou d'eau oxygénée devient moins efficace. Les fruits fraîchement cueillis deviennent donc difficile à désinfecter et, au cours du conditionnement et du transport, peuvent subir une contamination croisée (Ukuku et al., 2005).

Dans une évaluation de risque (Gale, 2005), il est estimé que seul 90 % du sol adhérent aux légumes-racines est éliminé par lavage, avec les bactéries, virus et parasites qu'il contient. L'auteur de la publication utilise également une moyenne arithmétique de la concentration de pathogène sur les végétaux consommés, mais, d'après l'US EPA (US-EPA, 2008) ce type d'approche surestime le risque car la répartition des germes sur les végétaux n'est pas homogène.

Des phénomènes d'interaction métabiotique, c'est-à-dire relatifs à la capacité pour un organisme préinstallé de favoriser la survie et le développement d'un organisme arrivant dans un milieu donné a été observé sur les végétaux entre certains champignons et bactéries pathogènes. Ainsi, sur les tomates, la présence de *Fusarium* favorise la survie de *Salmonella sp.* et la présence d'*Aspergillus fumigatus* (très fréquent dans le compost) favorise elle la survie d'*E. coli* O57:H7 (Ingham et al., 2004).

Une publication (Gerba et Smith, 2005), reprise par l'US-EPA (US-EPA, 2008) fournit les valeurs maximales suivantes de durée de vie sur les plantes des différentes catégories d'agents pathogènes :

- bactéries : 1 mois (maximum général) à 6 mois (maximum absolu)
- virus : 1 mois (maximum général) à 2 mois (maximum absolu)
- protozoaires : 2 jours (maximum général) à 5 jours (maximum absolu)
- helminthes : 1 mois (maximum général) à 5 mois (maximum absolu)

La durée de vie sur les plantes est généralement plus courte que dans les sols, ce qui s'explique probablement par une exposition plus importante aux UV et à la dessiccation.

Les bactéries, en dehors des phytopathogènes comme *Agrobacterium* ou des symbiotes bien connus comme *Rhizobium*, sont également susceptibles de pénétrer à l'intérieur des organes végétaux, de migrer ensuite vers d'autres organes et de s'y développer. Ce processus appelé « internalisation » a été montré chez certains pathogènes tels que *E. coli* O7:H57 et *Salmonella enterica*. Des tomates ayant poussé pendant 1 jour dans un milieu hydroponique contenant environ 4,5 log UFC/m de *Salmonella enterica* ont montré, 9 jours après exposition, des teneurs supérieures à 3,3 log UFC/g MS de ces bactéries dans les tiges et les feuilles (Guo et al., 2002). Après mise en contact par application d'un amendement organique ou d'eau d'irrigation contaminée, *E. coli* O57:H7 peut pénétrer dans les racines de laitue puis migrer dans les feuilles consommables (Solomon et al., 2002). La présence de *E. coli* O57:H7 dans certains jus de pommes non pasteurisés seraient liée également à l'internalisation de cette bactérie dans le fruit, la rendant insensible au traitement désinfectant (Burnett et al., 2000).

#### **2.4.4. TRANSFERT DES AGENTS INFECTIEUX DANS LES PRODUITS ANIMAUX, VIANDE ET LAIT**

De nombreux agents infectieux pathogènes pour l'homme sont capables d'infecter des animaux d'élevage vivants et également de se multiplier dans les produits animaux consommés par l'homme tels que la viande, les œufs ou les produits laitiers. Les maladies animales transmissibles à l'homme, et vice-versa, sont appelées zoonoses. Certains agents pathogènes pour l'homme peuvent provoquer des infections asymptomatiques chez les animaux et être ainsi excrétés par ceux-ci sans que les éleveurs ou les Services vétérinaires soient alertés : c'est le cas de *Salmonella enterica* qui ne produit généralement pas de symptômes chez les poules pondeuses infectées (MAP et al., 2005). Les ruminants infectés par *Listeria monocytogenes* peuvent également montrer une absence de symptômes ou des symptômes modérés tels que conjonctivites ou troubles respiratoires (MAP et al., 2008).

La contamination microbienne des denrées alimentaires d'origine animale (DAOA) se fait rarement de manière systémique (interne), les exceptions les plus connues étant :

- la contamination systémique possible du lait des ruminants atteints de brucellose, maladie à déclaration obligatoire due aux bactéries du genre *Brucella* ou atteints de rickettsiose (fièvre Q) due à *Coxiella burnetii*.
- l'infection de la viande de bœuf par *Teania saginata* après consommation de nourriture contaminée par les œufs de cet helminthe. La prévalence encore élevée de la taeniasse humaine en France atteste de la fréquence de ce type d'infection.



Certains virus comme celui de l'hépatite E pourraient également se multiplier dans la chair des porcs vivants (OMS, 2008).

Dans la plupart des cas de zoonoses transmises aux DAOA, la contamination se fait de manière externe, très généralement par contamination de la denrée par les matières fécales des animaux où se multiplient les germes pathogènes. La contamination peut se faire :

- dans les salles de traite : mains des opérateurs ou équipement souillés par les déjections des animaux,
- dans les bâtiments d'élevage : contamination du pis des vaches laitières par leurs déjections suivie d'une infection mammaire (mammites), contact des œufs avec les déjections des poules pondeuses,
- dans les abattoirs : contact direct avec les matières stercoraires (contenu du tube digestif) lors de l'éviscération, contact avec les mains ou les équipements des opérateurs,
- dans les lieux de conditionnement des œufs : contact avec les mains souillées des opérateurs.

Il faut également citer certains ectoparasites hématophages tels que le pou rouge des volailles, acarien de l'espèce *Dermanyssus gallinae* qui peut transmettre des germes pathogènes tels que *Salmonella enteritidis*. Des risques d'infection existent également par les aliments du bétail, le cas du prion est le plus connu parmi le grand public, mais les infections par *Salmonella* et *Toxoplasma gondii* sont également citées dans la littérature (Boutrif, 2002).

Les risques de contamination des produits alimentaires tels que la viande, les produits laitiers non pasteurisés et les œufs par des agents infectieux lors des différentes étapes qui relient « la ferme à la fourchette », ont fait l'objet de nombreux travaux : *E. coli* O157:H7 dans la viande hachée (FSIS, 2001), *Listeria monocytogenes* dans les plats préparés (WHO, 2004), *Campylobacter jejuni* dans la chair de poulet (WHO, 2009a). Pour chaque cas, une série de modèles est élaborée pour estimer les risques à chaque étape, puis le risque global. Dans chacun des cas, le point de départ est la prévalence de l'infection parmi les animaux des cheptels considérés. Il est donc systématiquement considéré qu'une nouvelle infection ne peut provenir que du contact avec un animal préalablement infecté, qui contaminerait la nourriture d'un animal sain par ses déjections, par exemple. Il faut néanmoins rappeler qu'aucune évaluation a posteriori du risque d'infection n'a été réalisée jusqu'à présent.

## 2.5. APPORT DES NOUVELLES TECHNIQUES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION DES GERMES À L'ÉVALUATION DE RISQUE MICROBIOLOGIQUE

### 2.5.1. TECHNIQUES DE PRÉLÈVEMENT ET D'ÉCHANTILLONNAGE

#### 2.5.1.1. Prélèvement des aérosols

Trois grands types d'échantillonneurs sont utilisés pour les prélèvements de bioaérosols émis par les unités de compostage ou autres (CSTB, 2006, Stagg et al., 2010, UK-EA, 2004) :

- les échantillonneurs à impact sur milieu solide (généralement gélose coulée dans une boîte de Pétri ou autres supports), appelés communément « impacteurs », qui présentent une grande variété en fonction du nombre et de la forme des orifices d'entrée de l'air et du nombre d'étages. On distingue ainsi les impacteurs à fente (*slit samplers*) et les impacteurs à orifices (*sieve samplers*) dont le plus répandu est l'impacteur Andersen, qui consiste en une série de plaques de gélose stériles avec milieu de culture sélectif ou non, séparées les unes des autres par des plaques perforées (cribles) de 400 orifices circulaires de diamètres décroissants à chaque étage, permettant une sélection de la taille des particules impactant les plaques. L'impacteur Andersen le plus fréquemment utilisé est constitué de six plaques (cf. Figure 2.5-1 gauche), avec deux plaques recevant les particules supérieures à 7 µm (sensées simuler la déposition nasale), deux plaques recevant les particules comprises entre 3 et 7 µm (déposition bronchique) et deux plaques recevant les particules de moins de 3 µm (déposition alvéolaire). Pour chaque taille de particules, la première plaque est couverte d'agar nutritif pour la culture des bactéries hétérotrophes et la seconde de Malt agar pour la culture des champignons. L'échantillonneur est relié à une pompe présentant un débit habituel de 28,3 l/mn et l'échantillonnage dure en général entre 3 et 10 mn, la difficulté consistant à éviter la saturation des plaques. Après échantillonnage, les plaques sont mises en culture entre 25 et 40°C et entre 2 et 10 jours selon le microorganisme recherché. Ce type d'échantillonneur existe également en version de 1 à 8 étages. Il existe également des impacteurs portables et autonomes (batteries) à un seul étage, tels que l'échantillonneur SAS (Surface Air System) avec 220 ou 260 orifices et l'échantillonneur MAS-100 à 400 orifices. Parmi les impacteurs à fente les plus utilisés on trouve le Casella MK II qui dispose d'une surface d'impaction rotative permettant une analyse séquentielle de la flore aéroportée. Les impacteurs sont utilisés pour le comptage direct et éventuellement l'identification ultérieure des bactéries et des spores de champignons viables. Certains utilisent simplement des bandes couvertes d'une substance adhésive pour permettre l'observation directe de spores de champignons (CSTB, 2006).
- Il existe également des impacteurs centrifuges où l'air y est aspiré par un vortex dans lequel les particules ayant suffisamment d'inertie vont quitter le flux d'air et s'impacter sur les parois de l'appareil (cas de l'échantillonneur de type cyclone), ou encore sur une surface de collecte telle que de minces bandes d'aga (cas de l'échantillonneur de type Reuter (RCS de Biotest) (CSTB, 2006)). L'échantillonneur cyclone est généralement en verre et de forme conique (entonnoir), ce qui permet à l'air introduit de s'écouler selon un mouvement hélicoïdal, les particules impactées sur la paroi étant entraînées vers un collecteur par circulation d'un liquide. Ce dispositif permet la collecte de gros débit d'air et est donc bien adapté à des atmosphères peu concentrées en bioaérosols (CSTB, 2006). L'échantillonneur Reuter (RCS) est léger, autonome et portable, et présente l'avantage de ne pas nécessiter de débitmètre qui perturbe le prélèvement, le débit étant calculé en fonction de la vitesse de rotation. Les dénombrements réalisés avec les impacteurs centrifuges sont généralement supérieurs à ceux obtenus avec les impacteurs statiques (Placencia et al., 1982).
- les échantillonneurs à impact sur milieu liquide appelés communément « impinger », dont les modèles les plus simples consistent à faire circuler l'air aspiré par un tube étroit (capillaire) à travers un liquide (eau tamponnée) stérile enfermée dans un petit flacon laveur qui piège les particules de toute taille. L'impinger est relié à une pompe à vide de débit variant généralement entre 10 et 15 l/mn. Les impingers sont généralement construits intégralement en verre (*All Glass Impinger*), ce qui peut poser des problèmes de reproductibilité des résultats d'un appareil à l'autre car il est difficile de fabriquer des instruments en verre absolument identiques. Des modèles en acier ont été développés mais semblent peu employés (UK-EA, 2004). Il existe également des impingers à trois étages permettant un fractionnement des particules correspondant au système respiratoire (voies supérieures, bronches et alvéoles pulmonaires (CSTB, 2006)). Contrairement aux impacteurs, les

impingers sont peu sensibles à la saturation mais le liquide de collecte peut s'évaporer rapidement par bullage. Récemment, un nouveau type d'impinger (*Biosampler*, cf. Figure 2.5-1 droite) a été développé qui permet une impaction tangentielle des particules sur le liquide, ce qui permet de réduire le bullage et limiter l'évaporation du liquide de collecte (CSTB, 2006). Les impingers sont utilisés pour identifier et compter tous types d'agents infectieux et non infectieux dans l'air, quel que soit le niveau d'empoussièrement. Ce type d'échantillonneur est également utilisé pour capter des bioaérosols liquides, comme lors de l'épandage de boues liquides (Paez-Rubio et al, 2007 ; Tanner et al, 2005).



**Impacteur de type Andersen à 6 plaques**



**Impinger de type Biosampler**

**Figure 2.5-1 : Systèmes de prélèvement des aérosols**

- Les échantillonneurs à filtre, qui se caractérisent selon le média filtrant : fibre (par exemple, fibre de verre ou de quartz), membrane filtrante «classique» en ester de cellulose, PVC, PTFE ou gel de gélatine ou filtre en polycarbonate, dont la porosité est obtenue par bombardement de neutrons. Dans le cas des fibres, les particules se déposent dans une épaisseur relativement importante et doivent ensuite être éluées. Dans le cas des membranes filtrantes, les particules sont recueillies soit en surface, soit dans l'épaisseur (faible) de la matrice et les membranes peuvent être déposées directement sur milieux de cultures. Ces filtres peuvent également être lavés et les extraits concentrés ou dilués pour des investigations plus poussées. Dans le cas des filtres en polycarbonates, les particules se déposent uniquement en surface et le comptage des agents infectieux (bactéries ou spores) peut se faire par observation directe, après désorption et concentration sur filtre 0,2  $\mu\text{m}$  et traitement par un colorant fluorescent de l'ADN (acridine orange). Les porosités varient de 0,01 à 10  $\mu\text{m}$  et le rendement de la collecte est en principe de 100 % pour les particules de diamètres supérieures à la porosité. Les filtres à membrane classique ou polycarbonate sont disposés dans des cassettes en plastiques de 25 ou 37 mm de diamètre qui peuvent être ouvertes ou fermées, cette dernière option permettant de sélectionner la collecte de particules inhalables. Ces systèmes légers sont bien adaptés à un échantillonnage individuel, en milieu professionnel, par exemple (CSTB, 2006). Le débit de pompage est en général de 2 l/mn et la durée adaptée à l'empoussièrement du milieu. Les filtres permettent également le prélèvement et le dosage des agents non infectieux (endotoxines, glucanes, etc.), à condition que la matière soit suffisamment inerte, quartz par exemple (Stagg et al., 2010).

Parmi les principales caractéristiques à prendre en compte pour le choix d'un échantillonneur de bioaérosols on peut citer :

- l'efficacité physique de collecte, qui intègre l'efficacité de captage, c'est-à-dire la proportion entre les particules du milieu ambiant et celles entrant dans le système, et l'efficacité de dépôts entre les particules entrantes et les particules déposées sur le milieu de collecte. L'efficacité de captage est fonction du diamètre des particules et se définit généralement par un diamètre de coupure, c'est-à-dire pour lequel 50 % des particules sont prélevées.

Abusivement, le diamètre de coupure est parfois considéré comme celui au dessus duquel l'ensemble des particules est collecté. Les diamètres de coupure sont fonction de la configuration/section des voies d'entrée (fentes, orifices ou tubes) et de la cinétique du prélèvement, ils sont généralement compris entre 0,3 et 7,5  $\mu\text{m}$  (CSTB, 2006). L'efficacité du captage peut être définie par calcul ou expérimentation, mais est susceptible d'évoluer avec l'usage de l'échantillonneur (position par rapport au vent, dépôts pariétaux, etc.). L'efficacité de dépôt dépend de la nature et de la forme du milieu de collecte. Par exemple, les impingers de types anciens peuvent parfois laisser repartir des particules par bullage excessif alors que cet inconvénient est très réduit avec les impingers de type *Biosampler* (CSTB, 2006).

- l'efficacité biologique de collecte, qui représente la capacité de l'échantillonneur à préserver la viabilité microbienne durant le prélèvement. La viabilité des cellules peut en effet être altérée par un ensemble de stress liés à la vitesse d'écoulement de l'air, à l'admission (proche de la vitesse du son dans les tubes capillaires d'impingers) et aux conditions environnementales (siccité de l'air, température extrême, présence de polluant). La collecte sur filtre provoque également une forte mortalité des cellules, ce qui fait que cette technique est souvent réservée au comptage des formes de résistances (spores de champignons, endospores de bactéries Gram(+)) (CSTB, 2006).
- Le volume et, par conséquent, le temps de prélèvement, qui dépendent de la concentration dans l'air des agents à dénombrer. Les impacteurs sont généralement utilisables dans une gamme relativement étroite de concentration (30 à 300 UFC par boîte de Pétri), ce qui nécessite l'utilisation de plusieurs débits et/ou temps de prélèvement lorsque que l'on ne connaît pas a priori la concentration des germes dans l'air. De même le liquide de collecte de l'impinger s'évapore pendant le prélèvement, ce qui limite à 30 mn la durée de prélèvement des impingers de première génération, mais cette contrainte peut être levée avec un impinger de type *Biosampler* et l'utilisation d'un liquide moins volatil que l'eau (CSTB, 2006).

Dans tous les cas, le dénombrement des germes par mise en culture doit se faire dans un délai très court pour éviter l'évolution (généralement négative) de l'échantillon de germes. Le délai de 24 heures semble un maximum (CSTB, 2006).

#### 2.5.1.2. Prélèvement en milieux solides ou liquides

Les prélèvements microbiologiques en milieux solides (boues, compost, sol amendés, etc.) et liquides (eaux usées, boues liquides, etc.) doivent tenir compte des contraintes liées :

- à l'hétérogénéité des milieux. Cette contrainte entraîne la nécessité de multiplier les échantillons, de prélever des quantités suffisantes pour assurer la présence de l'ensemble des constituants du milieu (par exemple, copeaux de bois dans le compost) et de procéder à une homogénéisation des échantillons, généralement après poolage et broyage.
- au risque de contamination par introduction de germes ou autres matières organiques lors du prélèvement. Cette contrainte nécessite la stérilisation des matériels (récipients et instrument de collecte, broyeurs, homogénéisateurs, pipettes, etc.) et des produits utilisés (liquide de dilution, solution tampon, milieu d'enrichissement, etc.). Les différentes manipulations de laboratoire seront également effectuées en milieu stérile (air filtré par des hottes).
- à l'évolution de l'échantillon (croissance ou décroissance de certains germes, inactivation d'agents non infectieux) entre les phases de prélèvement, de traitement des échantillons et d'analyses microbiologiques ou autres. Cette contrainte entraîne des modalités particulières de transport de stockage des échantillons (température maintenue inférieure à 10°C, mais sans gel du milieu) et impose un délai très court entre le prélèvement et les analyses biologiques (24 heures maximum).

Les procédures spécifiques afférentes aux prélèvements biologiques dans les matrices complexes telles que les boues d'épuration sont standardisées.

## 2.5.2. RAPPELS SUR LES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION CLASSIQUES, RÉCENTES ET ÉMERGENTES

### 2.5.3. TECHNIQUES DE CULTURES ET D'OBSERVATION

Pour les bactéries et les champignons, les méthodes classiques, déjà anciennes, mais encore parfois seules à être standardisées, consistent à mettre en contact un échantillon brut ou préparé (dilution ou suspension dans l'eau) du milieu contenant le germe à identifier et un milieu de culture adapté. Le milieuensemencé peut être liquide ou solidifié à l'aide d'un gélifiant (gélose, le plus fréquemment) et est incubé à une température favorable, par exemple 37°C ou plus pour les pathogènes humains. Cette culture permet, soit simplement d'augmenter significativement la population des germes ciblés (enrichissement), soit également de favoriser sa multiplication par rapport à celle d'autres germes si le milieu est suffisamment sélectif (sélection). Par exemple, un milieu à base de tétrathionate permet la sélection du genre *Salmonella*. S'il s'agit d'un germe anaérobie, la culture se fera bien entendu à l'abri de l'oxygène. Des tests physiologiques et enzymatiques sur cultures, individuels ou en batteries (screening) permettent la détermination taxonomique du germe (bactéries en particulier), au moins au niveau genre et espèce. La plupart des protocoles d'identification combinent la sélection et le screening et permettent d'obtenir des cultures pures de bactéries.

La technique des suspension-dilutions croissantes d'un échantillon permet de dénombrer les bactéries ou champignons recherchés contenus dans cet échantillon : méthode du nombre le plus probable de germes (ou NPP).

Pour les virus, les cultures ne peuvent se faire que sur les milieux vivants (cultures de cellules humaines ou de primates), ce qui complique le protocole et rend sa mise en œuvre plus délicate, sans compter les problèmes de bio-sécurité.

La recherche de protozoaires ne fait pas recours aux cultures mais à l'observation microscopique directe avec ou sans coloration, des formes de résistance (kystes des *Giardia* ou oocystes des *Cryptosporidium*), après concentration de l'échantillon par filtration et centrifugation différentielle.

Ces techniques éprouvées et souvent standardisées ont l'inconvénient majeur de prendre beaucoup de temps (souvent plusieurs jours comprenant, préparation, ensemencement, croissance et identification) et sont donc peu adaptées dans le cadre d'interventions sanitaires urgentes, sans compter que certaines bactéries ou virus se développent très lentement en laboratoire. De plus, les souches virulentes des espèces bactériennes ne sont pas toujours identifiables par ces techniques.

#### 2.5.3.1. Techniques immunologiques

Les techniques immunologiques sont basées sur la réaction spécifique anticorps-antigène et permettent donc une sélection (screening) fine et rapide des espèces bactériennes ciblées pour peu que certains de ses antigènes soient caractérisés ainsi que les anticorps correspondants. Le test immuno-enzymatique **ELISA** (Enzyme-linked immunosorbent assay) est le plus fréquemment utilisé et est basé sur une réaction antigène-anticorps conjugué à un enzyme ayant la propriété de convertir un substrat donné en un composé coloré ou fluorescent. Dans la méthode répandue dite « sandwich ELISA », un anticorps spécifique du germe ciblé, appelé anticorps de capture, est fixé aux parois d'un puits dans lequel on introduit le milieu contenant le germe. Celui-ci se fixe sur l'anticorps puis on introduit un anticorps secondaire, dit anticorps de détection, conjugué à l'enzyme. L'anticorps secondaire se fixe à son tour sur le germe cible ainsi pris en sandwich entre les 2 anticorps. Après lavage on introduit le substrat dont la transformation par l'enzyme produira un changement de couleur ou une émission fluorescente. Si le germe est fixé dans le puits, l'enzyme l'est également et le test est positif. En pratique le puits est en fait la pointe d'une pipette, ce qui permet de simplifier les prélèvements et lavages. Le test peut devenir quantitatif en traitant simultanément une série de suspension-dilutions de l'échantillon à analyser. Des tests ELISA ont été mis au point pour un grand nombre de bactéries pathogènes tels que *E. coli* (plusieurs sérotypes dont O157:H7), *Salmonella* (plusieurs sérotypes dont Typhimurium), *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, etc.). La technique ELISA s'applique également aux toxines bactériennes telles que les entérotoxines de *Staphylococcus aureus* ou encore les endotoxines. Les seuils de détection sont inférieurs au nanogramme de toxines (Tortora et al., 2003).

Les techniques d'immunofluorescence classiques utilisent directement des anticorps rendus fluorescents par combinaison avec un fluorochrome. Elles permettent non seulement d'identifier, mais

également de compter les germes cibles marqués par l'anticorps fluorescent en faisant passer le milieu liquide dans lequel ils ont été recueillis et/ou cultivés à travers un ajutage fin couplé à un ensemble laser-détecteur de fluorescence (technique dite de cytométrie en flux). Le laser excite les anticorps fluorescents, ce qui produit un signal électrique décelable relié à un compteur. De plus, la dispersion de la lumière renseigne sur la taille, la forme et la densité des bactéries marquées, ce qui, après traitement informatique, augmente encore la spécificité du comptage. Il est également possible de trier les cellules marquées en les faisant passer à travers un champ électrique. La cytométrie basée sur l'immunofluorescence est également développée sur milieu solide (impaction sur polymère hydrosoluble puis concentration sur filtre avec lecture au laser) ce qui permet de compter des germes transportés par l'air (Vanhee et al., 2009).

Une autre application de l'immunologie est la concentration des germes cibles par **séparation immuno-magnétique** (IMS en anglais). La technique dite des **perles paramagnétiques** (paramagnetic beads en anglais) consiste à utiliser des microbilles de quelques  $\mu\text{m}$  de diamètre douées de propriétés paramagnétiques sur lesquelles ont été fixés des anticorps des bactéries ciblées. Un champ magnétique permet alors de séparer les germes cibles des constituants de leur matrice susceptibles de perturber les analyses ultérieures, notamment celles reposant sur l'amplification génique. Plus récemment, les billes ont été remplacées par des nanoparticules magnétiques, ce qui a permis une augmentation du taux de capture de *E. coli* O157:H7 dans un extrait de viande de bœuf. La technique IMS couplée à la PCR (cf. infra) permet la détection de *E. coli* O157 :H7 à partir d'1 UFC/25g de nourriture et de *Listeria monocytogenes* à partir de 1,1 UFC/g de jambon (Padmapriya et al, in (Zourob et al., 2008)).

Les techniques immunologiques s'appliquent principalement aux bactéries mais également, et de plus en plus, aux protozoaires, notamment pour leur séparation du milieu et concentration avant examen. Les limites de ces techniques encore insuffisamment reculées, concernent la spécificité (le site de fixation de l'anticorps peut être commun à plusieurs espèces), la sensibilité (détection difficile à moins de 1000 cellules/mL dans le réactif final) et également l'influence du stress et du milieu sur l'expression des protéines bactériennes, qui peut diminuer le taux d'immunoréaction (Padmapriya et al, in (Zourob et al., 2008)).

### 2.5.3.2. Méthodes d'amplification génique (PCR)

Les méthodes d'amplification du génome, et leur figure de proue : l'amplification de chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction en anglais, ou acronyme PCR, utilisé fréquemment en français) ont connu depuis la fin des années 80 un développement exceptionnel en microbiologie mais également dans de nombreux autres domaines (police scientifique, archéologie, généalogie, génie génétique, etc.). La technique de base, appelée PCR en point final, consiste à multiplier un court segment issu d'un long brin ADN « matrice » provenant, en microbiologie, d'un germe ciblé qui peut être une bactérie, un virus ou un protozoaire. Le segment à amplifier, dit « amplicon », est bien entendu sélectionné pour être spécifique de l'espèce ou de la souche ciblée. Chez les bactéries, l'amplicon est généralement choisi dans la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S, considéré comme un bon marqueur taxonomique. En effet, ce gène a évolué très lentement et est constitué de séquences hautement conservées et de séquences variables, spécifiques à l'espèce. La petite taille de ce gène (1540 nucléotides) a permis son séquençage chez de très nombreuses bactéries. Chez les Eucaryotes tels que protozoaires et champignons, c'est dans le gène codant pour l'ARNr 18S (équivalent du 16S chez les procaryotes) que l'amplicon sera choisi.

Sans trop entrer dans les détails, l'amplification se fait par cycle de 3 étapes ayant chacune leur propre température de réaction<sup>1</sup>:

- 1) dénaturation de l'ADN à 95 °C : les deux brins d'ADN se séparent
- 2) hybridation ou appariement (entre 56 °C et 64 °C) de deux amorces sur les simples brins d'ADN aux extrémités de l'amplicon à amplifier. Chaque amorce, également appelée « primer » est une très courte chaîne nucléotidique (une vingtaine de bases) introduite dans le milieu réactionnel en concentration relativement importante par rapport à l'ADN. Les amorces sont évidemment spécifiques de l'amplicon.
- 3) élongation à 72 °C : synthèse du brin complémentaire d'ADN le long de la séquence encadrée par les deux amorces, synthèse réalisée par la polymérase à partir des nucléotides (dNTP) introduits dans le milieu.

<sup>1</sup> Une présentation animée du processus, élaborée par l'ENS Lyon, est disponible en ligne à l'adresse <http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/principe/anim/presentation.htm>

Chaque étape du cycle dure moins de 2 minutes et la réaction se fait dans un très petit volume de réactif (20 à 50 µL) au sein d'un appareil appelé « thermocycler ». L'ensemble des cycles thermiques décrits ci-dessus, sont répétés un grand nombre de fois dans le même tube. Chaque fois, l'amplicon est dénaturé, hybridé et dédoublé une fois de plus, de telle sorte que le nombre d'amplicon suit une fonction exponentielle d'ordre 2 et peut dépasser rapidement le milliard, l'ADN matrice devenant alors quantité négligeable devant la portion d'ADN amplifiée. Le produit de l'amplification subit ensuite une électrophorèse classique sur gel d'agarose avec coloration de bromure d'éthidium et peut être analysé et comparé à un nucléotide de référence.

Une détection de bactéries par PCR en point final peut être terminée en moins de 24 heures, ce qui représente déjà un progrès considérable par rapport aux techniques de cultures. La spécificité de la PCR est également suffisante pour fiabiliser les détections. Aussi, depuis quelques années, les méthodes d'identification par PCR commencent à être homologuées : par exemple la norme AFNOR PCR XP T90-471 (avril 2006) pour la recherche de *Legionella*. La PCR peut être également utilisée pour détecter des germes dans des séries de suspensions-dilutions mises en culture et devenir ainsi une technique de dénombrement de haute spécificité par calcul du nombre le plus probable de germes (Most Probable Number PCR ou **MPN-PCR**).

Le génome étant universel dans le vivant, la PCR peut s'appliquer aussi bien aux bactéries qu'aux virus ou qu'aux protozoaires et champignons. La méthode rend également possible et rapide l'identification de bactéries et virus difficilement cultivables.

Depuis la mise au point de la PCR en point final, et face aux enjeux commerciaux qu'elle représente dans le domaine biomédical entre autres, cette technique n'a cessé d'être améliorée pour en augmenter la spécificité, la souplesse, la rapidité et le caractère quantitatif. Parmi les dizaines de méthodes dérivées de la PCR en point final, on retiendra les plus utilisées dans le domaine des germes pathogènes associés aux déchets :

- la **PCR mutiple** (multiplex PCR) permet l'amplification de plusieurs amplicons et donc l'identification simultanée de plusieurs (jusqu'à 9) germes dans le même tube. Un autre usage est de cibler plusieurs (jusqu'à 6) séquences d'ADN d'un même germe pour augmenter la spécificité de la détection. Cette technique utilise donc plusieurs couples d'amorces.
- le **PCR emboîtée** ou nichée (nested PCR en anglais) permet, par le jeu de 2 paires d'amorces, d'amplifier un segment particulier niché au sein d'un amplicon. Cette technique augmente donc la spécificité et permet d'éviter les problèmes de contaminations de l'échantillon par du matériel génétique non ciblé. Elle permet également de travailler avec du matériel génétique subissant un fort taux de mutation, comme celui des virus.
- la **reverse transcriptase PCR** ou RT-PCR consiste à amplifier un fragment d'ARN. L'ARN étant instable, il faut d'abord le dupliquer en ADN à l'aide de la polymérase inverse, puis appliquer les protocoles PCR à l'ADN ainsi créé. La RT-PCR présente une plus grande spécificité que la PCR sur ADN. Elle permet également de travailler sur l'ARN messager (ARNm) qui ne survit pas à la mort des cellules (contrairement à l'ADN), et donc de ne prendre en compte que les cellules vivantes. De plus, la RT-PCR est particulièrement adaptée à la détection des virus à ARN tels que les rotavirus et astrovirus. Une variante de la RT-PCR est la technique **NASBA** (amplification basée sur la séquence d'acide nucléique) qui utilise trois enzymes d'amplification travaillant à la même température (41 °C), ce qui évite l'utilisation du thermocycler. Cette technique très rapide a été utilisée sur les rotavirus et astrovirus d'eaux usées (Jean et al., 2001).
- la **PCR quantitative** (qPCR) encore appelée **PCR en temps réel** (real-time PCR ou real-time quantitative PCR ou RTQ-PCR), mise au point au début des années 90, constitue une avancée majeure dans la mesure où elle permet de quantifier le matériel génétique ciblé, et donc d'estimer le nombre de germes. Au cours de l'amplification, une sonde fluorescente s'apparie, soit à un segment de l'amplicon simple brin entre les phases de dénaturation et d'élongation (technique Taqman), soit à l'ADN double brin néoformé (technique SYBR). La fluorescence est produite, soit au moment de l'élongation par action de la polymérase sur la sonde (Taqman), soit au moment de l'appariement de la sonde avec l'ADN double brin (SYBR). Dans les deux cas, la production d'énergie lumineuse est proportionnelle au nombre de cycles d'amplification. Le nombre de cycles nécessaire pour que cette énergie atteigne un certain seuil est liée à la quantité d'ADN cible présent au début de la réaction et à l'efficacité de la PCR (facteur de multiplication réel d'amplicons à chaque cycle, compris généralement entre 1,75 et 2,3). Ce type de PCR est réalisé dans un thermocycler muni d'un photomètre (LightCycler™ de Roche Diagnostic, par exemple) réglé sur la longueur d'onde adéquate qui permet de construire la courbe [nombre de cycles, fluorescence], qui présente une allure

sigmoïde. L'efficacité de la PCR est estimée par étalonnage avec des échantillons de dilution croissante. La technique Taqman présente une meilleure spécificité que la technique SYBR mais est plus coûteuse. D'autres techniques plus sophistiquées de marquage de l'amplification telle que le FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), qui utilise l'hybridation de 2 sondes fluorescentes entrant en résonance ou encore les *molecular beacons* (balises moléculaires) ont été également développées. La connaissance de la quantité d'ADN contenu dans chaque cellule permet d'estimer le nombre de cellules du germe présentes dans l'échantillon initial. L'unité de mesure de la PCR quantitative est l'unité génome, qui basiquement comptabilise tant les cellules mortes que vivantes.

Les différentes techniques de PCR peuvent être combinées en fonction de la recherche effectuée et des germes étudiés : par exemple, la RTQ-PCR, qui permet de quantifier les bactéries viables d'une souche donnée, ou la PCR en temps réel nichée sont fréquemment réalisées. Les avantages incontestables des techniques basées sur la PCR par rapport aux techniques classiques basées sur les cultures et l'observation portent à croire qu'elles les remplaceront quasi-totalement à terme. Pour l'étude des germes pathogènes en particulier, qui nécessite des techniques sachant distinguer les souches virulentes dans les délais les plus courts possibles, les techniques de PCR deviennent incontournables, tant pour les diagnostics de flambées de maladies que dans le cadre de la surveillance de la qualité des milieux (eau potable, nourriture, eau de baignade ou air de certains ateliers de travail soumis à des risques biologiques). La plupart des bactéries responsables de toxoinfection alimentaires (*Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157:H7) ont été dénombrées à l'aide de la PCR quantitative par la méthode Taqman (China et al., 2002).

Les techniques de PCR ont été également bien développées pour la détection des champignons pathogènes, notamment les producteurs de toxines, les responsables de mycoses ou d'invasions opportunistes chez les personnes immunodéprimées (candidoses, par exemple). Il s'agit le plus souvent de PCR en temps réel portant sur les gènes codant pour l'ARNr 18S ou 28S, l'ADN mitochondrial ou, le plus souvent, celui codant pour l'ARN non fonctionnel de l'Espaceur Interne Transcrit (ITS en anglais), qui a été séquencé chez un grand nombre d'espèces (Hsu et al, 2003). Le problème de la mélanine, inhibiteur connu de polymérase, présente dans les parois de nombreux champignons - dont ceux du genre *Aspergillus* - a été résolu et des préparations existent actuellement pour l'extraction d'ADN de champignons à partir de cultures (spores ou hyphes) ou d'échantillons cliniques (Alshahni et al., 2009).

Les techniques de PCR requièrent au préalable la lyse des cellules bactériennes et de champignons, qui se fait en général mécaniquement par utilisation de broyeur à microbilles. L'extraction du matériel génétique des virus peut se faire directement ou après action d'une protéinase (da Silva et al., 2007).

### 2.5.3.3. Puces à ADN

Les puces à ADN (*DNA-microarray* ou *DNA-chip* en anglais) sont constituées d'un ensemble de fragments d'ADN monocaténaire appelés sondes fixés dans des micropuits. Les micropuits sont organisés en réseau régulier sur un support (lame de verre ou autres). Des dizaines de milliers de sondes peuvent être ainsi fixées sur une même puce qui mesure environ 6 x 3 cm. En résumé, les sondes sont mises en contact avec l'ADN à tester (après sa dénaturation en simple brin ou sa synthèse à partir d'ARN). Les sondes hybridées avec de l'ADN à tester sont ensuite détectées par l'utilisation d'un pigment fluorescent conjugué à un anticorps se fixant sur les doubles brins d'ADN. La puce est ensuite balayée par un analyseur qui mesure la fluorescence de chacun des micropuits et l'information est traitée par un programme biostatistique.

La technique des puces à ADN est applicable à l'ensemble des microorganismes : bactéries, virus, champignons et protozoaires.

Dans le cas d'échantillons environnementaux où les concentrations des germes sont faibles, l'utilisation de puces à ADN nécessite une amplification préalable du matériel génétique de manière ciblée par PCR multiple par exemple, ou non ciblée, par d'autres techniques dites « amplification au hasard » (Vora et al., 2004). Ces amplifications ont permis la détection d'*E. coli* dans une eau de rînage de poulet à partir de 55 UFC/mL (Call, 2003 in (US-EPA, 2005)).

L'avantage des puces à ADN sur les techniques de PCR est qu'elles permettent un screening des germes présents dans le milieu contaminé sans nécessiter forcément des connaissances a priori des



germes recherchés. Ceci peut conduire à des économies substantielles de temps et de matériel de laboratoire et permettre des examens en grandes séries. Elles conviennent donc très bien à la surveillance des milieux.

Les publications relatant l'utilisation de puces à ADN pour la détection de germes pathogènes sont postérieures à 2001 avec une nette augmentation en 2007 (d'après les recherches sur la base PubMed). Les applications de cette technique dans ce cadre sont encore en développement.

#### 2.5.3.4. Biocapteurs

Un biocapteur (*biosensor* en anglais) est un outil ou un système d'analyse de petite dimension constitué d'un ligand fixé sur un support lui-même relié à un transducteur qui transforme le signal biochimique (issu de la liaison/récepteur) en un signal physique mesurable. Les biocapteurs sont utilisés pour des dosages chimiques ou biologiques. Les ligands peuvent être de diverses natures :

- enzymes spécifiques (biocapteur enzymatique) qui transforment le substrat à détecter/doser en un produit directement mesurable par le transducteur. Ce type de ligand est utilisé par exemple pour le dosage du glucose, de l'éthanol, des métaux lourds, des pesticides ou des antibiotiques
- anticorps (immunocapteur) : ce type de ligand est utilisé pour doser l'atrazine (herbicides), la pénicilline, certaines toxines microbiennes (aflatoxines et entérotoxines de staphylocoques) et une grande variété de bactéries pathogènes (*Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *E. coli* O157:H7).
- microorganismes vivants (biocapteur microbien) : bactéries, levures ou algues microscopiques. Cette technique est utilisée par exemple pour le dosage des matières grasses dans le lait.
- matériel génétique tel que les aptamères (simples brins d'ADN ou ARN).
- protéines aux propriétés particulières telles que les lipocalines (protéines permettant le stockage des composés organiques hydrophobes).
- empreintes moléculaires (polymères formés autour d'un ligand en conservant la mémoire stérique et chimique, et susceptibles d'interagir ensuite avec ce ligand comme dans le cas d'une interaction antigène-anticorps.

L'immobilisation du ligand sur le support peut se faire par adsorption physique (forces de Van der Waals de faible intensité et dépendante du pH), par liaison covalente, ou encore par polymérisation électrochimique constituant un réseau de molécules organiques englobant le ligand.

Les biocapteurs peuvent prendre un grand nombre de formes: billes, membranes, fibres optiques, tubes capillaires, nanotubes de carbone, etc.. Ils peuvent être à usage unique (par exemple, languettes de dosage de glucose dans le sang des personnes diabétiques) ou recyclables.

Le signal physique émis par le transducteur peut être électrochimique (ampérométrie, potentiométrie, spectroscopie d'impédance), manométrique, piézoélectrique, thermique ou encore optique (absorbance, fluorescence, onde évanescence, résonance plasmonique de surface). L'appareil de mesure du signal associé au biocapteur est très généralement de taille modérée et facilement transportable sur le terrain.

Les biocapteurs utilisés pour la recherche de bactéries pathogènes sont le plus souvent constitués d'anticorps fixés directement ou indirectement (système avidine-biotine) à un support à base d'or. Ce support est relié à un transducteur optique (utilisation d'un enzyme avec marqueur fluorescent, comme pour la détection par ELISA) ou électrochimique (différence de potentiel liée à la fixation de la bactérie sur l'anticorps) (Lazcka et al., 2007).

Globalement, les principaux avantages des techniques à biocapteurs par rapport aux méthodes conventionnelles d'analyse ou d'identification chimique ou microbiologique sont :

- de pouvoir être réalisées en dehors des laboratoires, directement sur les sites potentiels de contamination avec un matériel portable.
- de nécessiter des prétraitements d'échantillons relativement simples.

- de présenter des niveaux de spécificité et de détection comparable à la plupart des techniques conventionnelles (cf. Tableau 2.5-1).
- de fournir des résultats en très peu de temps (délais de quelques minutes à 1 ou 2 heures) souvent plus rapidement que les techniques PCR
- de présenter des coûts d'investissement ou de fonctionnement très compétitifs une fois l'appareillage mis au point et fabriqué en série.

L'utilisation des biocapteurs à travers les publications traitant de la détection de germes pathogènes (essentiellement bactéries) montre une forte croissance dans les dernières années alors que le nombre des publications relatant des techniques basées sur les cultures, ELISA et l'électrophorèse sur gel a tendance à stagner (Lazcka et al., 2007).

Un biocapteur à spectrométrie d'impédance, très performant (détection à 500 UFC/mL, temps d'analyse 6 mn) et simple d'emploi a été mis au point récemment pour la détection de *Salmonella enterica* var Typhimurium (Nandakumar et al., 2008).

Il faut noter que les résultats des différentes techniques sont exprimés avec des unités de quantification spécifiques. Par exemple, la PCR quantitative fournit des « Unités Génomes » ou UG (CSTB, 2006), qui prennent en compte les cellules mortes ou vivantes et ne peuvent a priori être comparées aux UFC (unité formant colonies) fournies par les méthode de dénombrement basées sur les cultures. Cependant, l'UFC semble être communément utilisées pour définir les seuils de détection des différentes méthodes, ce qui sous entend que les échantillons à tester pour déterminer les seuils de détection font systématiquement l'objet d'un dénombrement classique par culture.

**Tableau 2.5-1** : Performances de différentes méthodes de détection de bactéries pathogènes d'après (Lazcka et al., 2007)

Bactérie	Technique	Echantillon	Durée d'analyse	Limite de détection (UFC/mL)	Année de publication
<i>Escherichia coli</i>	ELISA	viande de bœuf (hachis)	24 H	1200	2004
	PCR-ELISA	lait	5 H	100	2002
	PCR + électrophorèse	lait	2 H	1000	2002
	PCR quantitative	milieu de culture	5 H 20 mn	5	2005
	PCR quantitative	viande de bœuf (hachis)	3 H 20 mn	1600	2005
	qPCR + fluorescence	eau potable	30 mn	100	2003
	Biocapteur à fibre optique	culture pure	10 H	2900	2003
	Biocapteur conductimétrique	cultures mélangées de 5 bactéries	10 mn	79	2003
	Biocapteur conductimétrique	eau de lavage de légumes	6 mn	81	2004
<i>Legionella pneumophila</i>	Comptage de colonies	eau	5 à 14 jours	1	1998
	PCR	eau	1 à 2 H	1 à 10	1998
	Biocapteur SPR (*)	culture	2 H 20 mn	100	2003
<i>Campylobacter jejuni</i>	ELISA	mucus vaginal de vache	5 jours	100 000	2004
	PCR quantitative	suspension fécale de poulet	4 H	100	2004
	Biocapteur ampérométrique	carcasse de poulet	2 H	21 000	2001
<i>Listeria monocytogenes</i>	PCR quantitative	salade	< 8 H	1000	2004
	Biocapteur ampérométrique	lait	3 à 4 H	900	1999
<i>Salmonella spp.</i>	PCR - ELISA	lait	24 H	1000	2004
	Biocapteur ampérométrique	culture et eau	1 à 2 H	50 000	1996
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Biocapteur EIS (**)	culture	6 mn	500	2008 (***)

(\*) SPR : Surface Plasmonic Resonance - (\*\*) EIS : Electrochemical Impedance Spectroscopy

(\*\*\*) Référence ajoutée par l'auteur du rapport

### 2.5.3.5. Récapitulation des apports de chaque famille de techniques

Les techniques classiques basées sur les cultures permettent une identification au niveau de l'espèce et un dénombrement des entités (bactéries et virus) vivantes capables de se développer sur milieu de culture. Ces techniques sont cependant limitées au niveau :

- de leur universalité : certaines espèces bactériennes et certains virus se multiplient très difficilement in vitro
- de leur spécificité : ces méthodes ne permettent pas toujours d'identifier les divers sérotypes (souches) d'une même espèce bactérienne
- du délai d'obtention des résultats, qui nécessite plusieurs jours, ce qui est parfois incompatible en cas de gestion de crise sanitaire

Les techniques immuno-enzymatiques de type ELISA développées depuis plusieurs décennies ont permis une identification plus fine et simultanée de plusieurs souches ainsi qu'un dénombrement rapide par cytométrie de flux.

Les techniques d'amplification génique basées sur la PCR constituent une évolution substantielle dans l'identification des germes de divers types (bactéries, virus, et protozoaires). L'apport de ces

techniques concerne en premier lieu l'universalité et la spécificité car chaque type, espèce ou sérotype de germe, même difficilement cultivable, peut être détecté par PCR pourvu que son génome soit au moins partiellement décrit. Un deuxième avantage est la rapidité d'obtention des résultats, généralement inférieure à 24 heures. Les diverses déclinaisons de la PCR permettent une identification simultanée de plusieurs germes, l'identification de bactéries vivant dans des protozoaires, une quantification du matériel génétique et donc des entités microbienne et même exclusivement des entités vivantes. Certes nombre de ces techniques dérivées sont encore au stade du développement et du perfectionnement mais de grands espoirs sont permis étant donné le nombre d'équipes qui y travaillent et de publication qui sortent chaque mois.

Sur le modèle des puces électroniques, les puces à ADN permettent un screening simultané très rapide et facilement automatisable, de nombreuses souches bactériennes présentes dans un milieu donné. Elles sont particulièrement adaptées à la surveillance microbiologique des milieux.

Enfin, les biocapteurs présentent l'avantage d'être généralement transportables et facilement utilisables sur le terrain pour y détecter des germes pathogènes présumés.

#### **2.5.4. APPORT DES TECHNIQUES ÉMERGENTES DANS LE CADRE DE L'ÉVALUATION DU RISQUE MICROBIOLOGIQUE LIÉ AUX DÉCHETS : PCR ET TECHNIQUES DÉRIVÉES**

L'utilisation des techniques d'amplification génique dans le cadre de la microbiologie des déchets fait face aux contraintes suivantes :

- disposition d'une base de données génétiques, d'amorces et éventuellement de sondes (PCR temps réel) pour les germes pathogènes des déchets,
- complexité des matrices solides, liquides et aérosol,
- faible nombre de bactéries dans les échantillons,
- mélanges de nombreux germes d'espèces différentes dans un même échantillon.

Étant données leurs performances en termes de spécificité, de seuil de détection et de rapidité, les techniques basées sur la PCR ont été beaucoup développées pour les microorganismes pathogènes des aliments (viandes et végétaux) et des eaux de boisson (notamment bactéries et virus, mais également protozoaires). En conséquence le matériel génétique de référence (gène codant pour l'ARNr 16S, par exemple) est donc disponible depuis quelques années pour la grande majorité des souches de bactéries, virus et protozoaires pathogènes connus des déchets.

Les déchets constituent des matrices complexes riches en matières solides difficiles à séparer des corps bactériens et susceptibles de contenir certaines substances interférant avec ou inhibant l'amplification génique, telles que les acides humiques des sols, les lipides ou des protéines, sans compter la mélanine de certains champignons. Ces contraintes méthodologiques sont actuellement maîtrisées, au moins partiellement, par l'adjonction de composés « facilitateurs » tels que la sérumalbumine de bovin, la protéine gp32, la bêtaïne et autres inhibiteurs de protéinases (US-EPA, 2005). Ces composés se retrouvent dans des préparations commerciales, fréquemment sous forme de mini-colonne à travers laquelle est passé, avant PCR, l'extrait contenant l'ADN ou l'ARN à analyser. Les inhibiteurs de PCR affectent cependant encore la limite de détection des germes : par exemple, la limite de détection par PCR en temps réel de *Clostridium perfringens* dans le contenu intestinal des poulets de chair, est de 100 UFC/g dans l'iléon contre 10 000 UFC/g dans le caecum où le contenu est plus riche en inhibiteurs (Wise and Siragusa, 2005). Les inhibiteurs gênent également la quantification d'ADN par PCR quantitative. L'introduction d'un contrôle interne dans la réaction d'amplification (i.e. d'une quantité connue d'ADN test) permet de mettre en évidence la présence d'inhibiteur et leur influence sur la quantification (Stetzenbach et al., 2004).

Quand les germes recherchés sont peu nombreux dans la matrice, il faut souvent procéder préalablement à un enrichissement en milieu liquide pour les bactéries ou à une immuno-séparation pour les protozoaires. Le

Tableau 2.5-2 décrit les différents seuils de détection de germes pathogènes présents dans des matrices « déchets » avec ou sans enrichissement préalable. Une étude portant spécifiquement sur les boues stabilisées par voie anaérobie (digestion) ou aérobie (compostage) a montré que les résultats les plus fiables et les plus sensibles en matière de détection des pathogènes sont obtenus

après enrichissement sur deux milieux liquides successifs suivi d'une PCR en temps réel, utilisée de manière non quantitative (Burtscher and Wuertz, 2003). Dans ces publications, les limites de détection (exprimées en UFC/mL ou UFP/mL) sont déterminées par des méthodes classiques (cultures d'une aliquote des échantillons testés par PCR). La plus faible concentration de germes ainsi déterminée, ayant donné des résultats mesurables par PCR est considérée comme limite de détection (Burtscher and Wuertz, 2003, Inglis and Kalischuk, 2004).

**Tableau 2.5-2** Performances des méthodes d'amplification génique de détection de germes pathogènes dans les déchets ou assimilés (US-EPA, 2005)

Prétraitement	Bactérie	Echantillon	Durée d'analyse	Limite de détection	Année de publication
Aucun	Hepatitis A	Eau usée	< 24 H	10 <sup>6</sup> UFP/mL	Jean et al. 2001
	Rotavirus	Eau usée	< 24 H	3 000 UFP/mL	Jean et al. 2002
	<i>Salmonella spp.</i>	Boue digérée ou compostée	24 H	10 <sup>6</sup> UFC/g	Burtscher et Wuertz 2003
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Boue digérée ou compostée	28 H	10 <sup>6</sup> UFC/g	
		<i>Campylobacter jejuni</i>	Fèces de bétail	4 H	3 000 UFC/g
Séparation immuno-magnétique	<i>Campylobacter jejuni</i>	Fiente poulet	6 H	230 UFC/g	Rudi et al. 2004
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Eau turbide	< 24 H	50 oocystes / 100L	Baumner et al. 2001
Enrichissement non sélectif	<i>Salmonella spp.</i>	Boue digérée ou compostée	24 H	10 UFC/g	Burtscher et Wuertz 2003
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Boue digérée ou compostée	28 H	10 UFC/g	
Enrichissement sélectif	<i>Listeria monocytogenes</i>	Boue digérée ou compostée	28 H	10 UFC/g	Burtscher et Wuertz 2003
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Boue digérée ou compostée	28 H	10 UFC/g	
	<i>Salmonella spp.</i>	Boue digérée ou compostée	24 H	10 UFC/g	

La PCR est également appliquée pour des prélèvements d'aérosols par filtre ou impinger (barboteur). Les cellules bactériennes ou fongiques sont lysées mécaniquement par un broyeur à microbilles (billes de 0,1 mm pour bactéries et 0,5 mm pour champignons) puis l'ADN est extrait (kit commercial d'extraction). La PCR quantitative en temps réel permet notamment de quantifier un type (espèce, souche) de bactéries ou de champignons parmi une grande population. La quantité de matière génétique fournie par la PCR peut être ensuite convertie en nombre de cellules bactériennes ou de spores de champignon par m<sup>3</sup> d'air (Zeng et al., 2004, Oppliger et al., 2008).

Pour les bactéries, les résultats obtenus par PCR quantitative sont généralement supérieurs à ceux mesurés par impaction sur plaque d'agar (facteur 3 dans un élevage de poulet chez Oppliger (Oppliger et al., 2008). Pour les champignons des aérosols, la PCR quantitative indique le plus souvent des concentrations de spores supérieures de 1 à 2 ordres de grandeur à celles fournies par les techniques basées sur les cultures (Yamamoto et al., 2010, Vanhee et al., 2009, Lignell et al., 2008).

## **2.6. EVALUATION DE RISQUE MICROBIOLOGIQUE DANS LES FILIÈRES DE TRAITEMENT DES DÉCHETS**

### **2.6.1. NATURES ET MODES D'UTILISATION/TRANSFORMATION DES DÉCHETS SUSCEPTIBLES DE GÉNÉRER UN RISQUE MICROBIOLOGIQUE**

Dans le cadre de cette étude seront pris en compte des « déchets » ou des matières issues du traitement des déchets, susceptibles de contenir des agents pathogènes biochimiques ou biologiques en nombre a priori suffisamment important pour pouvoir provoquer des infections chez les populations générales dans des conditions habituelles de traitement ou d'utilisation des déchets. Les déchets d'activités de soins à risque infectieux (DASRI) et assimilés (pièces anatomiques) ne seront pas pris en compte dans l'étude. Ces déchets font en effet l'objet d'une réglementation particulière concernant leurs manipulation, collecte, emballage, stockage, transport et procédé d'élimination, qui prévient en principe tout risque de contamination des populations générales.

La Directive européenne 2000/54/CE concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition aux agents biologiques au travail, établit dans son Annexe 1, la liste indicative suivante des activités professionnelles présentant un risque biologique pour les travailleurs :

- travaux dans les installations de production alimentaire,
- travaux dans l'agriculture,
- activités professionnelles où il y a contact avec les animaux et/ou des produits d'origine animale,
- travaux dans les services de santé y compris dans les unités d'isolement et unités examens post-mortem,
- travaux dans les laboratoires cliniques, vétérinaires et de diagnostic, à l'exclusion des laboratoires microbiologiques de diagnostic,
- travaux dans les installations d'élimination des déchets,
- travaux dans les installations d'épuration des eaux usées.

Si cette liste d'activités est prise comme point de départ pour définir les déchets à prendre en compte, il convient d'éliminer d'abord les activités dans les services de santé et les laboratoires, qui génèrent essentiellement des DASRI. Les catégories de déchets potentiellement infectieux ou chargés agents biologiques pathogènes manipulés dans les activités restantes et susceptibles d'impacter non seulement les professionnels mais également les populations générales sont les suivants :

- eaux usées traitées,
- boues résiduaires de station d'épuration ou boues organiques issues des industries alimentaires, stabilisées mais non hygiénisées, c'est-à-dire qui n'ont pas subi de traitement de désinfection poussée telles que le chaulage ou le séchage thermique,
- poussières organiques provenant des activités d'élevage, d'industries alimentaires, textiles ou industries du bois,
- poussières organiques provenant de la manipulation et du compostage de déchets ménagers et assimilés et déchets verts,
- matières organiques animales, plus ou moins stabilisées (fumier, lisiers et autres).

Les impacts des poussières générées par les activités d'élevage, d'industries alimentaires, textiles ou industries du bois ont fait l'objet de nombreux travaux sur la santé professionnelle des employés de ces secteurs, par contre, il n'a pas été identifié d'évaluations sanitaires relatives à ces activités portant sur les populations générales. Cela s'explique vraisemblablement par le fait que ces activités sont généralement confinées dans des locaux fermés où le circuit d'aération est pourvu de dispositifs d'abattement de ces poussières. Il faut également rappeler que les effluents liquides issus de ces activités sont traités avant rejets pour être conformes aux eaux usées traitables en station d'épuration, puis subissent les mêmes traitements épurateurs que les eaux usées domestiques. Les déchets solides issus de ces activités et susceptibles de renfermer des agents biologiques pathogènes

(déchets non inertes et non dangereux) connaîtront en principe les mêmes filières de traitement que les déchets ménagers.

Du point de vue de la classification des déchets telle qu'elle figure dans le Code de l'Environnement, les catégories de déchets (non DASRI) pouvant contenir des agents biologiques en quantité suffisantes pour engendrer des problèmes sanitaires chez les employés de la filière et les populations générales sont présentées dans le

Tableau 2.6-1 et le **Tableau 2.6-2**.

Tableau 2.6-1 : Catégories de déchets susceptibles de renfermer des agents biologiques pathogènes (1)

Catégories par activité	Sous-catégories par nature
<b>02 DÉCHETS PROVENANT DE L'AGRICULTURE, DE L'HORTICULTURE, DE L'AQUACULTURE, DE LA SYLVICULTURE, DE LA CHASSE ET DE LA PÊCHE AINSI QUE DE LA PRÉPARATION ET DE LA TRANSFORMATION DES ALIMENT</b>	
02 01 déchets provenant de l'agriculture, de l'horticulture, de l'aquaculture, de la sylviculture, de la chasse et de la pêche	02 01 01 boues provenant du lavage et du nettoyage 02 01 02 déchets de tissus animaux 02 01 03 déchets de tissus végétaux 02 01 06 fèces, urine et fumier (y compris paille souillée), effluents, collectés séparément et traités hors site 02 01 07 déchets provenant de la sylviculture
02 02 déchets provenant de la préparation et de la transformation de la viande, des poissons et autres aliments d'origine animale	02 02 01 boues provenant du lavage et du nettoyage 02 02 02 déchets de tissus animaux 02 02 04 boues provenant du traitement in situ des effluents
02 03 déchets provenant de la préparation et de la transformation des fruits, des légumes, des céréales, des huiles alimentaires, du cacao, du café, du thé et du tabac, de la production de conserves, de la production de levures et d'extraits de levures, de la préparation et de la fermentation de mélasses	02 03 01 boues provenant du lavage, du nettoyage, de l'épluchage, de la centrifugation et de la séparation 02 03 04 matières impropres à la consommation ou à la transformation 02 03 05 boues provenant du traitement in situ des effluents
02 04 déchets de la transformation du sucre	02 04 01 terre provenant du lavage et du nettoyage des betteraves 02 04 03 boues provenant du traitement in situ des effluents
02 05 déchets provenant de l'industrie des produits laitiers	02 05 01 matières impropres à la consommation ou à la transformation 02 05 02 boues provenant du traitement in situ des effluents
02 06 déchets de boulangerie, pâtisserie, confiserie	02 06 01 matières impropres à la consommation ou à la transformation 02 07 05 boues provenant du traitement in situ des effluents
<b>03 DÉCHETS PROVENANT DE LA TRANSFORMATION DU BOIS ET DE LA PRODUCTION DE PANNEAUX ET DE MEUBLES, DE PÂTE À PAPIER, DE PAPIER ET DE CARTON</b>	
03 01 déchets provenant de la transformation du bois et de la fabrication de panneaux et de meubles	03 01 01 déchets d'écorce et de liège 03 01 05 sciure de bois, copeaux, chutes, bois, panneaux de particules et placages ne contenant pas de matière dangereuses
03 03 déchets provenant de la production et de la transformation de papier, de carton et de pâte à papier	03 03 01 déchets d'écorce et de bois
<b>04 DÉCHETS PROVENANT DES INDUSTRIES DU CUIR, DE LA FOURRURE ET DU TEXTILE</b>	
04 01 déchets provenant de l'industrie du cuir et de la fourrure	04 01 01 déchets d'écharnage et refentes 04 01 02 résidus de pelanage 0401 07 boues, notamment provenant du traitement in situ des effluents, sans chrome
04 02 déchets de l'industrie textile	04 02 10 matières organiques issues de produits naturels

Tableau 2.6-2: Catégories de déchets susceptibles de renfermer des agents biologiques pathogènes (2)

19 DÉCHETS PROVENANT DES INSTALLATIONS DE GESTION DES DÉCHETS, DES STATIONS D'ÉPURATION DES EAUX USÉES HORS SITE ET DE LA PRÉPARATION D'EAU DESTINÉE À LA CONSOMMATION HUMAINE ET D'EAU INDUSTRIELLE	
19 05 déchets de compostage	19 05 01 fraction non compostée des déchets municipaux et assimilés 19 05 02 fraction non compostée des déchets animaux et végétaux 19 05 03 compost déclassé 19 05 99 déchets non spécifiés ailleurs
19 06 déchets provenant du traitement anaérobie des déchets	19 06 03 liqueurs provenant du traitement anaérobie des déchets municipaux 19 06 04 digestats provenant du traitement anaérobie des déchets municipaux 19 06 05 liqueurs provenant du traitement anaérobie des déchets animaux et végétaux 19 06 06 digestats provenant du traitement anaérobie des déchets animaux et végétaux 19 06 99 déchets non spécifiés ailleurs
19 07 lixiviats de décharges	19 07 03 lixiviats de décharges ne contenant pas de déchets dangereux
19 08 déchets provenant d'installations de traitement des eaux usées non spécifiés ailleurs	19 08 01 déchets de dégrillage 19 08 02 déchets de dessablage 19 08 05 boues provenant du traitement des eaux usées urbaines 19 08 12 boues provenant du traitement biologique des eaux usées industrielles sans substances dangereuse 19 08 14 boues provenant d'autres traitements des eaux usées industrielles sans substances dangereuses
19 09 déchets provenant de la préparation d'eau destinée à la consommation humaine ou d'eau à usage industriel	19 09 01 déchets solides de première filtration et de dégrillage
19 12 déchets provenant du traitement mécanique des déchets (par exemple, tri, broyage, compactage, granulation) non spécifiés ailleurs	19 12 01 papier et carton 19 12 07 bois sans substances dangereuses 19 12 08 textiles
20 DÉCHETS MUNICIPAUX (DÉCHETS MÉNAGERS ET DÉCHETS ASSIMILÉS PROVENANT DES COMMERCES, DES INDUSTRIES ET DES ADMINISTRATIONS) Y COMPRIS LES FRACTIONS COLLECTÉES SÉPARÉMENT	
20 01 fractions collectées séparément (sauf section 15 01)	20 01 01 papier et carton 20 01 08 déchets de cuisine et de cantine biodégradables 20 01 25 huiles et matières grasses alimentaires
20 02 déchets de jardins et de parcs (y compris les déchets de cimetière)	20 02 01 déchets biodégradables
20 03 autres déchets municipaux	20 03 01 déchets municipaux en mélange 20 03 02 déchets de marchés 20 03 03 déchets de nettoyage des rues 20 03 04 boues de fosses septiques 20 03 06 déchets provenant du nettoyage des égouts

Il faut ajouter que les premières étapes de la filière des déchets ménagers et autres déchets banals, à savoir la collecte, le transport et le tri ne seront pas pleinement intégrées dans la présente étude car leurs effets sanitaires sur les populations générales n'ont pas fait l'objet de publications identifiées lors de la recherche bibliographique. Par contre, les résultats des études de santé professionnelle pertinentes portant sur les éboueurs et les opérateurs de tri pourront être valorisés dans le cadre de l'identification des dangers ou les relations dose-réponse.

## 2.6.2. PRÉSENTATION DE DÉMARCHES REPRÉSENTATIVES D'ERM AFFÉRENTES À LA FILIÈRE DÉCHET

La recherche bibliographique exhaustive qui a été réalisée a montré que l'information disponible sur l'impact sanitaire de la filière déchet sur les populations générales se focalisait quasi exclusivement sur deux types d'activités :

- les manipulations de déchets bruts et transformés sur les plateformes de compostage,
- l'épandage de boues résiduares stabilisées non hygiénisées sur les sols, à l'état liquide ou solide.

Les activités de collecte, tri, dépôts et autres valorisations de déchets municipaux ont été essentiellement étudiées sous l'angle de la santé professionnelle.



En fait, comme il est montré dans le Tableau 2.6-3, il s'avère que les problématiques d'ERM développées pour les activités de compostage et d'épandage de boues d'épuration sont applicables aux autres activités pertinentes de la filière déchet. Par conséquent, il est proposé d'exposer dans les deux chapitres suivants, les approches méthodologies et les éventuelles contraintes décrites dans la littérature pour ces deux types d'activité et de mentionner le cas échéant, les spécificités à prendre en compte pour les autres types d'activité.

**Tableau 2.6-3 : Activités de la filière déchet étudiées en terme d'ERM**

<b>Modes d'émission des déchets et leurs agents biologiques</b>	<b>Activités représentatives</b>	<b>Voie d'exposition et sources de contamination</b>	<b>Autres activités représentées</b>
Emission de particules par manipulation, transport et mélange des déchets	Plateformes de compostage	Inhalation de particules sèches de déchets bruts et/ou compost	Collecte, dépôts, tri, de déchets organiques sur centre de transit, avant incinération ou autre valorisation (méthanisation)
Emission de particule lors de l'aspersion	Epandage boues liquides	Inhalation de particules liquides (embruns)	Irrigation avec eaux usées traitées
Dépôt de boue sur le sol potentiellement destiné à la culture	Epandage des boues liquides ou solides	Ingestion (sol, végétaux cultivés, eau de boisson)	Epandage de matières organique animales
Remise en suspension de particules de sol après épandage		Inhalation de particules de sols solides	

## **2.7. EVALUATION DE RISQUE MICROBIOLOGIQUE DANS LE CAS DES PLATEFORMES DE COMPOSTAGE**

### **2.7.1. CONTEXTE ET FOND BIBLIOGRAPHIQUE**

Les émissions de poussières organiques et de bioaérosols par les unités de traitement de déchets ont fait l'objet d'un grand intérêt des autorités environnementales et sanitaires du Royaume-Uni depuis ces dix dernières années. Ces autorités ont entrepris un considérable travail de synthèse des connaissances et également d'études de terrain rapportées dans un ensemble de documents publiés entre 2003 et 2010. Ils sont présentés dans le Tableau 2.7-1.

Si l'objet de ce travail concerne en premier lieu la santé professionnelle, l'établissement de normes appliquées aux unités de traitement des déchets dans le but de protéger les populations riveraines (éloignement minimal des zones résidentielles, en particulier) s'affiche souvent clairement en deuxième objectif.

**Tableau 2.7-1 :** Publications des institutions britannique concernant le risque liées aux sites de compostage et traitement des déchets

Auteur	Année	Titre Référence	Commanditaire	Pages
Health and Safety Laboratory (HSL)	2010	Bioaerosol emissions from waste composting and workers exposure (Stagg et al., 2010)	Health and Safety Executive (UK)	120
Environmental Agency (UK)	2009	Review of methods to measure bioaerosols from composting sites (Cartwright et al., 2009)	Environmental Agency (UK)	69
Environmental Agency (UK)	2008	Bioaerosol in waste composting-deriving source terms and characterising profiles (UK-EA, 2008)	Environmental Agency (UK)	101
Health and Safety Laboratory (HSL)	2008	Collecting, transfer, treatment and processing household waste and recyclable (Turner et al., 2008)	Health and Safety Executive (UK)	678
Environmental Agency (UK)	2008	Development of Amenity Risk Assessments at Organic Waste Treatment Facilities (Drew et al., 2008)	Environmental Agency (UK)	51
Institute of Occupational Medicine (IOM)	2008	Exposure-response relationships for bioaerosol emissions from waste treatment processes (IOM, 2008)	Department of Environment, Food and Rural Affairs (UK)	208
Cranfield University	2008	Guidance on the evaluation of bioaerosol risk assessments for composting facilities (Drew et al., 2009)	Environmental Agency (UK)	39
Environmental Agency (UK)	2004	Monitoring of particulate matter around waste facilities (UK-EA, 2004)	Environmental Agency (UK)	144
The Compositing Association and HSL	2003	Occupational and environmental exposure to bioaerosols from compost and potential health effets. A critical review of published data (Swan et al., 2003)	Health and Safety Executive (UK)	116

## 2.7.2. DESCRIPTION DE L'ACTIVITÉ

Le compostage est un procédé naturel consistant à utiliser la microflore présente dans des résidus organiques (principalement champignons et actinomycètes) pour en décomposer la matière organique afin de la stabiliser en un produit susceptible d'être utilisé pour améliorer les sols. Les processus biologiques impliqués dans le compostage sont typiquement aérobies, d'où la nécessité, entre autres, d'étaler et de remuer régulièrement le substrat afin d'en assurer une aération suffisante, continue et uniforme. C'est une des principales filières pour le recyclage de la fraction organique des déchets ménagers, des déchets verts et des boues de station d'épuration. La haute température (autour de 60°C) atteinte naturellement par le substrat en cours de compostage a un effet hygiénisant en entraînant la destruction de la plupart des bactéries et virus pathogènes pour l'homme.

Le compostage se fait sur des sites propres ou au sein d'unités plus vastes de traitement des déchets (centre d'enfouissement, par exemple). La méthode classique consiste à réaliser des andains qui peuvent atteindre plus de 100 m de long entre lesquels l'air circule, périodiquement retournés. Des techniques récentes confinent le substrat dans de grands récipients ou tunnels dans lesquels l'aération est assurée mécaniquement. Les opérations génératrices de poussières organiques sont les suivantes :

- réception et entreposage des déchets bruts,
- broyage des déchets,
- mélange des déchets broyés avant la mise en andains ou en récipient,
- retournement des andains,
- stockage du compost.

La génération de bioaérosols est bien entendu tributaire des conditions météorologiques : vitesse du vent, température, humidité et pluviométrie.

### **2.7.3. IDENTIFICATION DES DANGERS**

#### **2.7.3.1. Agents pathogènes pertinents**

Les agents biologiques pathogènes ciblés dans les aérosols provenant des unités de compostage sont :

- des bactéries, dont principalement les Actinomycètes (Actinobactéries) qui sont des bactéries Gram(+) mésophiles ou thermophiles formant des endospores relativement résistantes,
- des champignons et leurs spores, avec une attention particulière pour *Aspergillus fumigatus*,
- des endotoxines, produites notamment par les bactéries Gram(-) qui sont détruites au cours du processus,
- des peptidoglycanes, produits par les bactéries Gram(+),
- des glucanes tels que le bêta-(1-3)-D-glucane.

Les virus, sensés être éliminés lors du processus, ne sont pas considérés pertinents pour les bioaérosols de compost.

En général, les études sur les bioaérosols de compost ne recherchent pas particulièrement d'espèces ou de souches déterminées de bactéries ou de champignons pathogènes, mais les mesurent plutôt globalement, comme indicateurs de nuisances. Seul le champignon *Aspergillus fumigatus*, responsable d'aspergillose pulmonaire qui peuvent prendre des formes très graves chez les sujets immunodéprimés, est parfois spécifiquement ciblé (Taha et al., 2006).

#### **2.7.3.2. Effets sanitaires observés**

Les agents pathogènes des aérosols issus du traitement des déchets sont connus pour provoquer principalement des effets respiratoires (toux, diminution des performances spirométriques) mais également des états nauséux et des maux de têtes. Ces effets ont été particulièrement observés chez les professionnels soumis à de fortes concentrations.

L'association dose-réponse a été montrée de manière incontestable à plusieurs reprises pour les effets respiratoires des endotoxines (INERIS, 2007a). Pour les autres agents, les associations dose-réponse sont moins claires (IOM, 2008).

Les individus atopiques ou asthmatiques se montrent particulièrement sensibles aux effets respiratoires des endotoxines et aérosols en général.

### **2.7.4. ESTIMATION DES EXPOSITIONS**

#### **2.7.4.1. Schéma conceptuel et voies d'exposition**

En matière de schéma conceptuel, et d'après la littérature consultée, l'impact des sites de compostage et plus généralement de traitement des déchets en termes de risque microbiologique se limite aux émissions et concentrations atmosphériques d'agents biologiques infectieux et non infectieux. Les contaminations des sols, d'eaux superficielles et souterraines semblent n'intéresser que les substances chimiques.

#### **2.7.4.2. Prélèvement et dénombrement des germes**

Les techniques spécifiques de prélèvement d'aérosols sont décrites au chapitre 2.3.3.

L'identification des bactéries et champignons se fait de plus en plus par amplification génique (PCR) après isolement des colonies sur plaques de gélose. L'identification des champignons par examen microscopique est encore pratiquée.

Les méthodes de dénombrement basées sur les cultures donnent des résultats bien inférieurs, parfois de 1 à 2 ordres de grandeur, aux méthodes de comptages directs (coloration fluorescente). Pour cette raison, l'emploi de filtres semble la technique la plus fiable et la plus pratique (légèreté) pour les dénombrements d'agents pathogènes dans les aérosols.

#### 2.7.4.3. Facteur d'émission et modélisation de la dispersion des aérosols

Les facteurs d'émissions d'aérosols et d'agents pathogènes associés peuvent être estimés pour les différents types de déchets ou composts par utilisation d'un tambour rotatif relié à une pompe à vide équipée d'un débitmètre. L'air aspiré à travers le tambour en rotation contenant le matériel pulvérulent passe à travers un filtre, retient les particules et permet leur mesurage (par exemple en  $\text{mg}/\text{m}^3$ ) et le mesurage des agents biologiques infectieux et non infectieux. Cette méthode a fait l'objet d'une standardisation européenne pour la détermination de l'index d'empoussièrement.

La modélisation de dispersion des aérosols avec estimation des concentrations et des retombées au sol peut être réalisée à l'aide des logiciels adaptés à la dispersion des particules tels que SCREEN3 (US-EPA), ADMS (CERC) ou ISC-AERMOD (US-EPA) (Taha et al., 2006). L'utilisation de ces modèles avec les résultats obtenus lors de prélèvements d'aérosols dans des conditions climatiques connues permet, par itération inverse, de reconstituer les facteurs d'émission pour les différents agents. Par exemple, Taha et al. utilisent un facteur d'émission de  $8800 \text{ UFC}/\text{m}^2/\text{s}$  pour *Aspergillus fumigatus* à la surface d'un andain de compost (Taha et al., 2006). Une fois les facteurs d'émission déterminés, la modélisation permet d'obtenir les concentrations moyennes d'agents dans l'air en divers points situés à l'intérieur, en limite ou à l'extérieur du site de compostage ou de traitement des déchets. Cette méthodologie peut donc être appliquée aux évaluations « *ex ante* » dans le cas de demande d'autorisation d'exploiter.

#### 2.7.4.4. Niveaux d'exposition mesurés

##### **Niveau de fond**

Les études portant sur les concentrations de fond dans l'air extérieur des agents biologiques montrent une grande variabilité des résultats, néanmoins, les résultats globaux suivants peuvent en être tirés (IOM, 2010) :

- les bactéries totales sont généralement inférieures à  $1000 \text{ UFC}/\text{m}^3$  en milieu urbain et suburbain, mais peuvent atteindre des niveaux beaucoup plus élevés en milieu rural, notamment près des unités d'élevage,
- les spores de champignons montrent une grande variation au cours de la journée et au cours de l'année. Des concentrations moyennes de  $100 \text{ spores}/\text{m}^3$  l'hiver et  $4000 \text{ spores}/\text{m}^3$  l'été ont été mesurées dans le centre-ville de Cardiff. La concentration de  $1000 \text{ UFC}/\text{m}^3$  est considérée comme une valeur repère en milieu urbain,
- les endotoxines montrent des concentrations de  $0,02$  à  $2 \text{ EU}/\text{m}^3$  dans les villes européennes. Le niveau de  $1 \text{ EU}/\text{m}^3$  est généralement considéré comme maximum dans les villes d'Europe et d'Amérique du Nord.

##### **Niveaux mesurés sur les sites de compostage et de traitement des déchets**

Les campagnes de mesures récentes réalisées sur 6 sites de compostages du Royaume-Uni ont montré les résultats suivants :

- les concentrations de bactéries totales et champignons mesurées au vent des sites de compostage sont représentatives des niveaux de fond, c'est-à-dire inférieurs à  $1000 \text{ UFC}/\text{m}^3$ ,
- près des sites de manipulation du compost, les employés peuvent être exposés à des niveaux supérieurs à  $100\,000 \text{ UFC}/\text{m}^3$  de bactéries ou champignons, et environ 30 % des prélèvements de bactéries et 10 % des prélèvements de champignons ont dépassé  $1 \text{ million UFC}/\text{m}^3$ . Les sites utilisant un procédé de compostage confiné ne semblent pas montrer d'émissions atténuées de bactéries et de champignons par rapport aux procédés ouverts,

- les concentrations en bactéries et champignons diminuent très rapidement lorsque l'on s'éloigne sous le vent des sites de manipulation du compost. Au-delà de 50 m, la majorité des prélèvements présentent des concentrations inférieures au niveau de fond de 1000 UFC/m<sup>3</sup>. Entre 100 et 250 m, 93 % des prélèvements de bactéries et 98 % des prélèvements d'*Aspergillus fumigatus* se montrent inférieurs à 5000 UFC/m<sup>3</sup>.

Ces résultats concordent avec une étude de modélisation qui a montré que les niveaux de fond sont atteints au-delà d'une distance de 100 m des sites de compostage (Taha et al., 2006). Une revue bibliographique actualisée (IOM, 2008) montre que la plupart des études révèlent une absence d'influence des sites de compostage au-delà de 200 m, même si quelques rares études allemandes ont montré une influence visible à plus de 800 m, avec des concentrations de bactéries supérieures à 100 000 UFC/m<sup>3</sup> à 200 m de distance.

L'étude IOM (IOM, 2008) relate près des sites de manipulation de compost, des concentrations d'endotoxines mesurées par équipements individuels allant jusqu'à 20 000 EU/m<sup>3</sup>, mais la plupart des études donnent des concentrations maximales inférieures à 2000 EU/m<sup>3</sup>. De manière générale, les sites de compostage présentent des niveaux d'endotoxines bien inférieurs à celui des bâtiments d'élevage, notamment d'élevage de volailles.

Les données sur les concentrations d'endotoxines dans l'air au-delà des limites des sites de compostage sont très rares. En fait, la première étude réalisée dans ce sens est très récente (Deacon et al., 2009) et a porté sur un grand site de compostage de déchets verts au centre de l'Angleterre. Des concentrations maximales de (seulement) 2,3 EU/m<sup>3</sup> ont été mesurées à proximité des postes de manipulation du compost alors que les concentrations au vent des installations étaient inférieures au seuil de détection (0,15 EU/m<sup>3</sup>). Les concentrations ont atteint 1,7 EU/m<sup>3</sup> en limite de site et 0,2 EU/m<sup>3</sup> à 80 m de distance sous le vent de l'installation. De manière inattendue et inexplicée, les niveaux d'endotoxines ont remonté à 0,7 EU/m<sup>3</sup> à 100 et 150 m de distance sous le vent.

### 2.7.5. RELATIONS DOSE-RÉPONSE

Une relation dose-réponse de type Valeur Toxicologique de Référence (VTR) à seuil a été construite pour l'exposition par inhalation aux endotoxines (Heederik & Douwes, 1997 cité par (INERIS, 2007a)). Sur la base d'une absence d'effets observés en population générale exposée à des poussières de coton, la concentration de 9 ng/m<sup>3</sup> a été considérée comme un NOAEL (No Observed Adverse Effect Level). Un facteur d'incertitude égal à 2 a été introduit pour tenir compte de la variabilité humaine et tenir compte des effets pulmonaires chroniques potentiellement causés par les endotoxines. Ainsi, une VTR = 9/2 = 4,5 ng/m<sup>3</sup> a été proposée. Cette VTR équivaut environ à 50 EU/m<sup>3</sup>, qui est également la valeur limite d'exposition professionnelle (VLEP) sur 8 heures établie en Hollande en 1998, ce qui est surprenant en regard des concentrations d'endotoxines très élevées mesurées dans des élevages de volailles.

Il n'a pas été encore élaboré de modèle dose-réponse pour *Aspergillus fumigatus*, qui est la seule espèce de microorganisme pathogène étudiée spécifiquement dans le cas des installations de compostage. L'étude de synthèse britannique (IOM, 2008) a récapitulé comme suit les données clés utilisables de relation exposition-réponse aux bioaérosols de compostage :

- pour les champignons (symptômes respiratoires, nausées, maux de tête, etc.) :
  - effets reportés à partir de 10 000 UFC et 1000 spores/m<sup>3</sup> chez les employés de la filière déchets,
  - accroissement des symptômes observés en population générale à partir de 2000 UFC/m<sup>3</sup> en air intérieur et 1000 spores/m<sup>3</sup> en air extérieur,
  - effets respiratoires modérés observés chez les enfants à partir de 350 UFC/m<sup>3</sup> en air intérieur.
- pour les bactéries totales (symptômes respiratoires, nausées, maux de têtes, etc.) :

- effets observés à 1000 CFU en population générale résidant à proximité des sites de compostage, mais association entre l'incidence symptômes et l'exposition très peu significative.
- pour les endotoxines (symptômes respiratoires, fatigue) :
  - plus grande prévalence des symptômes observée chez les employés de diverses industries à partir de 50 EU/m<sup>3</sup> (VTR), mais effets sur la fonction pulmonaire observés à partir de 4 ng/m<sup>3</sup> (40 à 60 EU/m<sup>3</sup>) chez travailleurs industriels (INERIS, 2007a). Association exposition-effets bien établie.
- pour le bêta (1-3)glucane (symptômes respiratoires, nausées, maux de têtes, etc.) :
  - pas d'effets néfastes observés à 1 ng/m<sup>3</sup>, faibles preuves d'effet néfastes à partir de 10 ng/m<sup>3</sup> en air intérieur chez la population générale.

Les études épidémiologiques liées aux aérosols chez les populations résidant à proximité des sites de compostage ou plus généralement de traitement des déchets sont rares, ainsi le risque lié à cette proximité est difficile à mesurer.

En dehors des endotoxines, aucun seuil d'effet n'apparaît clairement pour les agents biologiques constituant les aérosols émis par le site de compostage et de traitement des déchets. De plus, une partie notable de la population (peut-être supérieure à 10 %) et notamment les individus atopiques, est susceptible de développer des symptômes respiratoires à des concentrations de bioaérosols voisines des niveaux de fond rencontrés même en absence de sites émetteurs spécifiques. Les autres catégories sensibles sont les asthmatiques qui peuvent développer des hypersensibilités à certaines espèces de champignons et les sujets immunodéprimés particulièrement vulnérables aux infections à champignons opportunistes. Par contre, il n'existe pas de preuves tangibles de la sensibilité particulière des enfants et des personnes âgées aux bioaérosols, ni d'impacts des endotoxines sur les fœtus ou nourrissons de femmes enceintes ou allaitantes exposées à de fortes concentrations (IOM, 2008).

## 2.7.6. CARACTÉRISATION DU RISQUE

Les risques liés aux aérosols sur les unités de compostage ou d'autres traitements de déchets restent préoccupant pour les employés exposés aux fortes concentrations (broyage, mélange, tamisage, mélange, retournement des andains), même si les niveaux mesurés d'endotoxines sont bien inférieurs à ceux rencontrés dans les bâtiments d'élevage (HSL, 2010). Le danger n'est pas clairement établi pour les populations riveraines.

Les études de modélisation et les campagnes de prélèvements multi-sites effectuées récemment au Royaume-Uni (Stagg et al., 2010) montrent l'efficacité de la distance minimale légale de 250 m dans l'abattement des agents pathogènes qui ne dépassent pas à ce niveau les concentrations de fond observées en zones urbaines et périurbaines. D'autres études ont montré une augmentation de ces niveaux à des distances bien supérieures lors d'épisodes climatiques particulièrement favorables (IOM, 2008). Les études épidémiologiques portant sur les populations résidant à proximité des sites de traitement des déchets sont très rares. L'une d'elle (Herr et al., 2003) a néanmoins montré une augmentation significative de la prévalence des irritations respiratoires ressenties (réveil dû à la toux, bronchite, essoufflement, sifflement) chez les populations résidant à 150 – 200 m d'un site de compostage. Cette étude transversale allemande basée sur des questionnaires a pris en compte les facteurs de confusion tels que la perception de mauvaises odeurs, le tabagisme actif et passif, le compostage domestique ou la résidence près d'une rue à forte circulation automobile. Cette étude semble actuellement cependant la seule en son genre et ses résultats mériteraient d'être validés par d'autres investigations.

## **2.8. EVALUATION DE RISQUE MICROBIOLOGIQUE DANS LE CAS DE L'ÉPANDAGE DE BOUES**

### **2.8.1. NATURE DES BOUES DE STATION D'ÉPURATION ET JUSTIFICATION DE L'ÉVALUATION DE RISQUE MICROBIOLOGIQUE**

Les boues résiduelles proviennent du traitement biologique des eaux usées qui consiste principalement à débarrasser ces eaux :

- de leurs débris, huiles et graisses : traitement préliminaire (dégrillage, dessablage, déshuilage). Ces refus rejoignent les filières de traitement des déchets solides,
- de leur particules fines : traitement primaire (décantation fine),
- de leurs matières organiques : traitement secondaire biologique basé sur une aération intense du milieu favorisant le développement de bactéries hétérotrophes minéralisant le carbone organique (nombreux process utilisés : boues activées, chenaux d'oxydation, lits bactériens, etc.).

Les boues de traitement biologique se divisent en boues primaires et secondaires issues des traitements du même nom :

- les boues primaires sont donc constituées de particules fines décantables (jusqu'à 50 µm) de natures minérales ou organiques,
- les boues secondaires sont majoritairement constituées de corps bactériens, plus particulièrement des bactéries (non pathogènes) qui ont minéralisées une grande partie de la matière organique biodégradable.

Les boues primaires et secondaires, récupérées sous forme liquide, sont épaissies à 5 % de siccité et mélangées. Elles sont ensuite généralement stabilisées, après avoir subi ou non une déshydratation à 25 % de siccité (boues pâteuses) par différents procédés alternatifs tels que stabilisation aérobie, digestion anaérobie, chaulage, séchage thermique ou solaire, ou encore compostage.

L'épandage des boues est une des principales filières de valorisation de ces sous-produits organiques. En France, environ 60 % des boues biologiques sont valorisées de cette manière. Les boues épandues sont à 80 % stabilisées. La plus grande partie de l'épandage est réalisée sur des parcelles agricoles, les épandages en forêt ou sur des sols non agricoles étant relativement marginaux. Les boues sont épandues sous formes liquide (boues épaissies), pâteuse (boues déshydratées) ou solide (boues ayant subi une déshydratation poussée, séchées, chaulées).

Les boues brutes au sortir du traitement des eaux usées contiennent certaines quantités d'agents infectieux qui ont survécu au traitement physique (décroissance naturelle des germes dans l'eau en condition fortement aérobie) et biologique (concurrence écologique des autres bactéries). L'introduction de ces agents infectieux dans les eaux usées provient principalement des matières fécales des hommes et animaux infectés : on considère par exemple que 5 % des matières fécales extraites des carcasses d'animaux dans les abattoirs sont déversées dans le réseau d'égout public (INERIS, 2007b).

Il est considéré que les boues compostées, séchées et chaulées, ont été quasiment débarrassées de leurs agents infectieux tels que bactéries, virus et parasites pathogènes étant données les hautes températures (60°C et plus) mises en jeu dans ces procédés. L'épandage de ces boues « hygiénisées » n'est donc pas sensé générer de risques sanitaires significatifs.

Les autres types de boues, stabilisées ou non, peuvent encore contenir des quantités notables d'agents infectieux qui peuvent ainsi, pendant et après épandage, contaminer différents médias (sol, air, végétaux cultivés, etc.) auxquels les populations professionnelles (agriculteurs) et générales (résidents, consommateurs) peuvent être exposées. Il est donc légitime de soumettre leur épandage à une EQRM.

## 2.8.2. IDENTIFICATION DES DANGERS

### 2.8.2.1. Agents pathogènes pertinents

En principe, l'ensemble des agents pathogènes se développant dans le tube digestif des hommes et des animaux est susceptible de se retrouver dans les boues non hygiénisées. A ces agents, il faut ajouter des agents pathogènes se multipliant naturellement dans les eaux naturelles ou traitées (telles que les *Legionella*) ou simplement capables de survivre un certain temps dans celles-ci (telles que les protéines infectieuses (prions)).

Pour éviter les listes trop longues et fatalement incomplètes seront énumérées ci-après, à titre d'exemple, les pathogènes d'intérêt sanitaire pour lesquels il existe des données fiables de concentrations dans les boues destinées à l'épandage (INERIS, 2007b) :

- bactéries : *Salmonella spp.*, *E. coli* O157:H7, *Clostridium perfringens*, *Listeria spp.*, *Campylobacter jejuni* ou *coli.*, *Shigella spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*,
- virus : Enterovirus, virus Hépatite A, Reovirus, Adenovirus, Rotavirus, Astrovirus, Calicivirus (Norovirus et Saporovirus),
- helminthes : *Ascaris spp.*, *Necator americanus*, *Toxicara canis*, *Trichiurus trichiura*, *Himenolepis nana*, *Taenia saginata*,
- protozoaires : *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*,
- agents non conventionnels : prions.

Les champignons pathogènes qui sont très préoccupants dans les composts ne sont généralement pas pris en compte dans les ERM liées à l'épandage de boues, même si certains d'entre eux y ont été identifiés. Il est considéré que les boues constituent de mauvais substrats de prolifération des champignons. Pour cette raison également, les agents non infectieux associés aux champignons (glucanes) sont généralement ignorés.

Les endotoxines sont prises en compte uniquement dans le cas d'exposition par inhalation de boues liquides durant l'épandage (Brooks et al., 2004, Paez-Rubio et al, 2007, Pepper et al, 2008). Cependant, il faut considérer le fait que les sols agricoles, même non amendés, contiennent également des endotoxines, en quantités parfois comparables à celles contenues dans les boues. Les résultats des mesures de terrain montrent en effet que les boues contribuent moins que les poussières de sols agricoles, soulevées par le tracteur avant épandage, à l'aérosolisation des endotoxines.

### 2.8.2.2. Effets sanitaires observés

Certaines des bactéries citées ci-dessus peuvent causer des maladies graves : *E. coli* O157:H7 (gastroentérites hémorragiques), *Listeria monocytogenes*, (méningites, encéphalites, septicémies et infection intra-utérines abortives), *Shigella spp.* (shigelloses), *Samonella spp.* (salmonelloses), d'autres sont opportunistes (*Aeromonas hydrophila*).

Les virus cités (notamment entérovirus) sont généralement responsables de gastroentérites, hormis les adénovirus responsables de maladies respiratoires, et le virus de l'hépatite A.

Les protozoaires cités sont principalement responsables de maladies diarrhéiques et de douleurs abdominales. *Entamoeba histolytica* est l'agent responsable de la dysenterie amibienne.

Les helminthes cités sont cause de divers symptômes : douleurs intestinales et fatigue (*Taenia*), troubles digestifs et maladies du foie et des poumons (*Ascaris*), anémie (*Trichiuris*) ou encore fièvres et symptômes neurologiques (*Toxicara*).

Il faut noter que certains de ces agents ont disparu de France (*Ascaris spp.*), ou sont connus uniquement dans les DOM-TOM (*Entamoeba histolytica*, *Necator americanus*).



## 2.8.3. ESTIMATION DES EXPOSITIONS

### 2.8.3.1. Schéma conceptuel et voies d'exposition

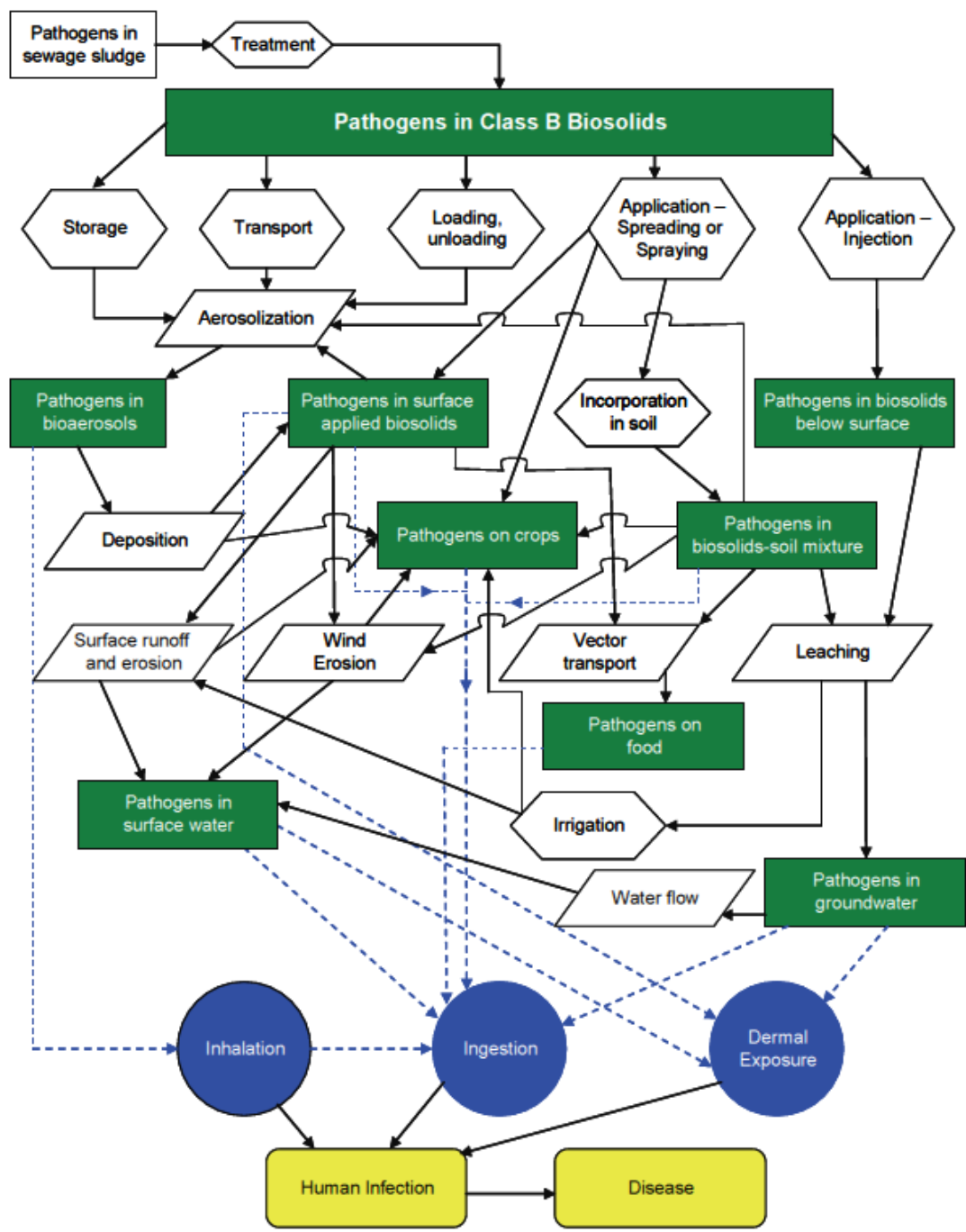
Pendant longtemps, les risques microbiologiques liés à l'épandage de boues se sont limités soit à la contamination possible des produits végétaux, soit au contact et à l'inhalation de boues liquides pendant l'épandage. Des schémas conceptuels relativement exhaustifs permettant de connaître les différents flux et concentration des agents infectieux pendant et suite à l'épandage de boues - tels que montré Figure 2.8-1 - n'ont été développés que très récemment par l'US-EPA (2008) pour les boues non hygiénisées (class B biosolids).

Le schéma conceptuel de la Figure 2.8-1 laisse apparaître que les trois voies d'exposition sont envisageables, mais, pour les raisons déjà évoquées (cf. 2.3), la voie du contact cutané est difficile à prendre compte pour le risque microbiologique. Par contre, certains scénarios d'exposition a priori n'apparaissent pas dans le schéma conceptuel de l'US-EPA, comme par exemple :

- la consommation directe de sol par les adultes ou enfants fréquentant les parcelles amendées,
- la contamination du bétail et le transfert d'helminthes tels que *Taenia saginata* dans la viande de bœuf,
- la remise en suspension de sol amendé dans l'air sous l'effet du vent et l'exposition par inhalation des populations vivant à proximité de la parcelle amendée.

Les scénarios ayant fait l'objet d'EQRM publiées jusqu'à présent dans la littérature se résument en fait essentiellement à :

- l'exposition par inhalation à l'aérosol créé lors de l'épandage de boues liquides (brumisation) ou, moins fréquemment, dispersion des boues solides, pour l'agriculteur épandeur (Tanner et al., 2008, INERIS, 2007b) et pour les populations riveraines (Pepper et al., 2008, Brooks et al., 2005b),
- la consommation de végétaux crus et non épluchés, ayant poussé sur du sol amendé. Il peut s'agir de légumes racines tels que les carottes, de légumes feuilles tels que les salades, ou de fruits frais tels que fraises, melons, etc. (Navarro et al., 2009, Gale, 2005, INERIS, 2007b),
- la consommation de végétaux feuilles ou racines s'étant développés sur un sol ayant subi la déposition d'aérosols provenant de boues épandues sur un champ voisin (INERIS, 2007b),
- la consommation de poussières de sol d'un jardin contaminé par la déposition d'aérosols provenant de boues épandues sur un champ voisin (INERIS, 2007b),
- la consommation de poussières de sol d'un jardin contaminé par le sol d'une parcelle amendée, transporté par érosion déposition hydrique et éolienne (INERIS, 2007b).



**Figure 2.8-1 :** Schéma conceptuel général pour l'évaluation de risque microbiologique lié à l'épandage de boues non hygiénisées (Class B biosolids) d'après (US-EPA, 2008)

Il faut noter qu'il est admis pour de nombreux agents infectieux qu'une certaine fraction des germes entrant dans l'organisme par voie respiratoire passe dans le système digestif. Cette fraction est estimée le plus souvent à 10 % (US-EPA, 2008) mais parfois à 50 % (Brooks et al., 2005b) . Cette hypothèse repose sur le fait que les germes sont souvent adsorbés sur des particules organiques dont une certaine proportion subit, après inhalation, un transfert vers le tube digestif par transport par l'escalator muco-ciliaire le long de l'arbre bronchique jusqu'à l'oropharynx. La proportion de particules transportées dépend entre autres de leur profil granulométrique et les valeurs de 10 et 50 % ne sont pas clairement justifiées dans les publications.

La contamination des eaux souterraines par les pathogènes contenus dans les boues a fait l'objet de plusieurs publications portant sur les vitesses de transport, mais sans aller jusqu'à une véritable évaluation de risque. Une publication récente récapitulant les résultats de ces études conclut à un

risque négligeable en dehors des zones karstiques où la percolation des eaux pluviales est très rapide (Pepper et al., 2008).

La pertinence des scénarios d'exposition varie en fait selon les réglementations et pratiques appliquées dans les différents pays. L'épandage des boues, en particulier des boues non hygiénisées, est en effet réglementé eu égard à leurs teneurs potentielles en germes pathogènes et en métaux lourds. En particulier, la réglementation européenne prévoit un délai minimum de 3 semaines entre l'épandage de boues et la récolte ou le pâturage par le bétail et elle interdit l'épandage sur des parcelles destinées à la culture de fruits ou de légumes à l'exception des arbres fruitiers. L'épandage sur sols gelés ou couverts de neige est également interdit en France pour protéger les eaux superficielles.

### 2.8.3.2. Estimation des quantités d'agents pathogènes dans les boues

Les détections/quantifications ponctuelles d'agents infectieux dans les boues à étudier sont évidemment possibles sans trop de difficultés par utilisation de méthodes classiques (cultures, ELISA) ou plus avancées (PCR quantitative, etc.). Cependant les résultats ne seraient qu'indicatifs eu égard à la variabilité spatiale (difficulté d'obtenir un échantillon représentatif d'une grande quantité) et à la variabilité temporelle de la présence d'agents pathogènes dans les boues. Les quantifications spécifiques de bactéries ou de virus sont longues et/ou coûteuses, ce qui rend difficile leur réalisation fréquente ou en routine. Néanmoins, la généralisation des techniques avancées de PCR quantitative, biocapteurs et autres, laissent espérer un progrès considérable, tant au niveau du temps de réponse, que de la précision et du coût, des techniques de monitoring microbiologique.

Contrairement aux agents chimiques, les concentrations en pathogènes des boues ne peuvent être issues ni de bilans-matière, ni de normes d'émission ou de qualité (sauf en ce qui concerne les eaux usées traitées autorisées pour l'irrigation).

Une première approche consiste à utiliser des concentrations représentatives (moyennes, médianes, intervalles) d'agents pathogènes connus, applicables à des boues de certaines origines (eaux usées urbaines, abattoirs, etc.) et ayant subi une filière de traitement donnée. Ces données peuvent exister dans la littérature pour certains agents infectieux de grand intérêt sanitaire, dont la détermination est relativement aisée tels que Entérovirus et *Salmonella* spp. (INERIS, 2007b). Dans certains cas, la connaissance des teneurs d'agents pathogènes dans les eaux usées peut permettre d'estimer leurs teneurs dans les boues en appliquant des facteurs de concentration adéquats. Les études ont montré que pour les bactéries, environ 80 % des germes des eaux usées se retrouvent dans les boues brutes (avant stabilisation), alors que pour les kystes de protozoaires, les taux sont moins élevés : 25 % pour *Cryptosporidium* spp. et 50 % pour *Giardia* spp. (Gale, 2005). Cette estimation est relativement simple pour des agents ne subissant pas de modification durant les étapes de traitement, comme les kystes de protozoaires (estimation de *Cryptosporidium parvum* par l'INERIS (INERIS, 2007b) ou des œufs d'helminthes. Pour les bactéries et les virus, il faudrait faire également intervenir des facteurs de décroissance pertinents pour les types de traitement subis par les boues, notamment la digestion anaérobie qui est le traitement stabilisateur le plus répandu.

Une autre méthode consiste en une approche plus mécanistique basée sur un enchaînement d'hypothèses remontant jusqu'à l'origine de la contamination. Cette méthode est bien entendu indiquée lorsque les données précédentes sont indisponibles, dans le cas de pathogènes nouvellement apparus, dits « émergents », ou des souches particulières. Cette démarche a été adoptée pour la plupart des EQRM concernant la sécurité alimentaire par exemple : *E. coli* O157:H7 dans la viande hachée (FSIS, 2001) ou *Campylobacter jejuni* dans le poulet de chair (WHO, 2009a). Elle a été appliquée dans le cas des boues à *E. coli* O157:H7 par l'INERIS (INERIS, 2007b) avec la suite d'hypothèses suivantes :

- nombre de bovins abattus chaque année en France,
- (b) prévalence de l'infection chez les bovins,
- (c) nombre de bovins infectés abattus (= a\*b), (
- d) contamination des fèces en UFC/t,
- (e) poids de fèces par bovins,
- (f) contamination totale en UFC/an (= c\*d\*e),
- (g) part des fèces allant à l'égout,
- (h) part eaux égout allant aux stations d'épuration,
- (i) total des boues produites en France en t MS,
- (j) concentration moyenne du germe dans les boues en UFC/t MS (= f \* g \* h / i).

En toute rigueur, il faudrait tenir compte, tout au long de cette démarche de la variabilité et des incertitudes liées aux différentes valeurs adoptées pour chaque hypothèse.

### 2.8.3.3. Estimation des quantités d'agents pathogènes dans les médias d'exposition

A partir des concentrations d'agents pathogènes dans les boues, les concentrations dans les médias d'exposition (air, sol végétaux et autres) au moment où ceux-ci sont en contact avec les populations cibles (consommation de légumes ou autres) peuvent être estimées par des équations de transferts combinées à des coefficients de survie (ou plutôt de décroissance) ou éventuellement de multiplication.

Pendant l'épandage, le transfert dans l'air de boues liquides ou pâteuses sous forme d'aérosols, leur transport et leur redéposition à la surface du sol, dépend de nombreux facteurs dont, la siccité des boues, la nature de l'épandeur (hérisson, déflecteur, enfouisseur, rampes à buses, injecteur, etc.), et les facteurs environnementaux (vent, température, humidité) (Tanner et al., 2008). Des campagnes de mesures, avec des batteries d'échantillonneurs, ont été réalisées en situations réelles pour définir des facteurs d'émission des différents pathogènes durant l'épandage et caractériser la taille du panache. Une étude portant sur l'épandage de boues déshydratées (Paez-Rubio et al., 2007) a déterminé, à partir de mesures de terrains et d'itérations inverses d'un modèle de dispersion des PM<sub>10</sub>, des facteurs d'émission : 21 000 EU/s pour les endotoxines et 4900 UFC/s pour les coliformes totaux (Paez-Rubio et al., 2007). Une autre étude a montré que lors de l'épandage de boues liquides (8 % siccité), les émissions de *E. coli* dans l'air étaient 200 fois moindres que les émissions observées par épandage d'eau souterraine enssemencée avec la même concentration d'*E. coli* que celle contenue dans les boues. Il en a été déduit que certaines propriétés des boues limitent l'aérosolisation des germes lors de l'épandage (Tanner et al., 2005). Une autre explication serait que les gouttelettes générées par l'épandage de boues liquides sont de grande taille et retombent très rapidement (Brooks et al., 2005b).

Sur la base d'une étude de terrain avec mesures de coliphages MS-2 dans l'aérosol produit par épandage de boues liquides (tonne à buses), il a été possible de modéliser le transport des virus dans l'air (Brooks et al., 2005a). A partir des dénombrements de coliphages, un modèle simple de régression linéaire a été construit permettant de connaître la concentration de coliphages selon la distance au point d'émission en fonction de la concentration initiale, de la vitesse du vent et de la température (l'influence de l'humidité n'ayant pas été démontrée).

En dehors de la période d'épandage, il semble que l'aérosolisation « secondaire » par mise en suspension de sols amendé contribue de manière négligeable à la présence de pathogènes dans l'air (Tanner et al., 2008).

Les taux de décroissance dans les eaux et les sols sont relativement bien documentés pour les agents infectieux courants tels que *Salmonella spp.*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157:H7, *Listeria spp.*, *Giardia spp.* ; *Cryptosporidium spp.* (US-EPA, 2005). Les données pour l'eau et les végétaux sont plus rares (cf. chapitre 2.4).

### 2.8.4. RELATIONS DOSE-RÉPONSE

Des modèles dose-réponse, ou plus précisément dose-infection, ont été élaborés pour l'exposition par ingestion de nombreux agents infectieux que l'on peut retrouver dans les boues, en particulier :

- parmi les bactéries : *E. coli* O157:H7, *E. coli* O55, *E. coli* O111, *Samonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes.*, *Clostridium perfringens*, *Shigella spp.*,
- parmi les virus : Rotavirus, Enterovirus, Coxsackievirus B3, Adénovirus, Virus hépatite A,
- pour les protozoaires : *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*,
- parmi les helminthes : *Ascaris lumbricoides*,
- parmi les agents non conventionnels : prions.

En ce qui concerne l'exposition par inhalation aux agents contenus dans les boues, seul le Coxsackievirus A21 a fait l'objet d'un modèle exposition-réponse (cf. chapitre 2.3.3) auquel il faut

ajouter la VTR inhalation des endotoxines (cf. chapitre 2.7.5). Il est rappelé que les modèles dose-réponse par ingestion peuvent être appliqués à l'exposition par inhalation moyennant une réduction de 90 % de la dose absorbée (cf. chapitre 2.8.3).

La qualité de l'élaboration des modèles dose-réponse peut varier en fonction des études de référence, des méthodes, des données d'ajustement et de la prise en compte de la variabilité et des incertitudes (cf. chapitre 2.3.4). Quand plusieurs modèles sont disponibles pour le même agent, l'évaluateur se doit de justifier son choix, et pas seulement sur le critère de prudence, en choisissant le modèle maximisant la probabilité d'infection.

Il ne faut pas oublier que les modèles élaborés permettent une estimation des probabilités d'infection, et non directement les incidences de maladies.

## 2.8.5. CARACTÉRISATION DU RISQUE

Les EQRM relatives à l'épandage de boues en population générale ont fait l'objet de quelques publications, la plupart récentes, dont les résultats principaux sont exposés dans le Tableau 2.8-1 le Tableau 2.8-2.

Les risques d'infection individuels sont très variables selon les scénarios. Parmi les risques les plus élevés estimés, on peut citer :

- l'étude générique française (INERIS, 2007b) portant sur la contamination de jardins potagers par les retombées d'aérosols provenant de l'épandage de boues sur une parcelle voisine, avec des risques individuels de  $1,8 \cdot 10^{-2}$  (1,8 %) pour *Salmonella spp.*, de  $2,1 \cdot 10^{-4}$  pour *E. coli* O157:H7 et de  $4,4 \cdot 10^{-3}$  pour *Cryptosporidium parvum*. Cette étude fait l'objet d'une analyse critique dans la suite du rapport (cf. chapitre 2.9). Elle est essentiellement basée sur les données et les pratiques réglementaires françaises (en dehors des fonctions dose-réponse). Après avoir sélectionné de manière transparente, les agents, les fonctions dose-réponse et les scénarios d'expositions pertinents, l'exposition a été modélisée sur la base de coefficients de transfert dont certains étaient déterminés « à dire d'expert », notamment la proportion de boues épandues mise en suspension dans l'air puis transportée et déposée sur les jardins des riverains, qui n'est pas appuyée par les données bibliographiques ni les acquis de la modélisation de dispersion atmosphérique des particules. Comme cette re-déposition atmosphérique de boues sur les jardins a abouti au niveau de risque le plus élevé, la validité de ce résultat s'en trouve fragilisé et les auteurs ont préféré valoriser l'étude pour la hiérarchisation des scénarios et des agents en termes de risque. En ce qui concerne le risque associé au prion, l'INERIS adopte la méthodologie développée dans une étude anglaise (Gale and Stanfield, 2001). Cette étude anglaise est basée sur une chaîne d'hypothèses aboutissant, à partir de la proportion de cerveau et moelle épinière arrivant aux abattoirs qui est rejetée à l'égout (estimée à 1 %), le risque de contamination du bétail paissant sur des prairies amendées avec les boues de STEP contaminée (estimé à  $7 \cdot 10^{-5}$ /vache/an). L'INERIS a repris une partie de la chaîne d'hypothèses utilisée dans l'étude anglaise en appliquant des paramètres pertinents pour le contexte français afin d'estimer la concentration en prions des boues. A partir de cette concentration, le risque d'infection par le prion est calculé en fonction des scénarios d'exposition suivants décrits ci-dessus pour les autres pathogènes avec en plus le cas de la consommation de pommes de terre cultivées sur une parcelle amendée par les boues de STEP : dans tous les cas, le risque estimé est extrêmement faible (de l'ordre de  $10^{-17}$ ).
- l'étude expérimentale américaine (Brooks et al., 2005a) portant sur la modélisation de dispersion de bactériophages suite à un épandage de boues liquides. Le modèle de dispersion appliqué ensuite de manière générique à l'exposition par inhalation au Coxsackievirus permet de calculer un risque d'infection compris entre  $10^{-5}$  et  $10^{-7}$  par exposition (8 h/j) pour les riverains résidant à 30 m de la parcelle d'épandage. Le risque professionnel pour l'opérateur d'épandage était voisin de  $10^{-4}$  par jour. Un essai d'épandage en plein champ de boues liquides contenant une concentration connue d'*E. coli* et de coliphages MS2 (utilisés comme substitut des entérovirus) a permis, à l'aide de capteurs disposés à distances régulières d'établir un profil de concentration modélisé à l'aide d'une régression linéaire avec prise en compte de la vitesse du vent et de la température (cf. chapitre 2.8.3). Ce modèle, uniquement construit pour les coliphages (*E. coli* n'ayant pas a

priori survécu à l'aérosolisation), a été appliqué de manière générique à l'exposition des riverains situés à 100 pieds, soit 30 m. Le calcul a été réalisé pour trois estimations de concentration de virus dans la boue : 0,1, 1 et 10 virus/g MS, des durées d'exposition de 1 et 8 heures par jour et des distances de 30 et 100 m. Le risque annuel, basé sur 3 épandages par an, a également été calculé. L'étude confirme que la distance réglementaire de 100 pieds (30 m) est suffisante pour rendre le risque d'infection par virus acceptable. Aucune analyse de variabilité ou d'incertitude n'a été réalisée. La principale incertitude tient dans le fait que le Coxsackievirus est censé avoir le même comportement que le coliphage au niveau de la dispersion et de la survie dans l'aérosol. Cette hypothèse n'a pas fait l'objet d'une étude critique, ni même d'une discussion. Un résultat important est la disparition rapide d'E. coli lors de l'aérosolisation de la boue.

- l'étude nationale américaine (Brooks et al., 2005b) portant sur l'inhalation d'aérosols provenant du chargement ou de l'épandage de boues sur une parcelle située à 30 m, avec des risques individuels variant entre  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  pour Coxsackievirus et *Salmonella spp.*. Une campagne de prélèvements d'aérosols à l'aide d'impingers et d'analyses microbiologiques (comptage NPP pour les bactéries, UFP pour les coliphages et RT-PCR pour les virus) a été réalisée sur 10 sites américains où se déroulaient des épandages de boues liquides ou des chargements ou déchargements de boues solides, à des distances variées sous le vent. Les pathogènes recherchés ont été les Coliformes totaux (CT), E. Coli, *Clostridium perfringens*, coliphages, Entérovirus, HA virus et norovirus. Les résultats des comptages de germes se sont montrés très variables selon les sites mais le chargement des boues solides s'est avéré la source la plus importante de germes dans l'air. Il a été ensuite décidé de prendre les CT comme indicateurs des bactéries et les coliphages comme indicateurs des virus et d'appliquer le modèle de dispersion de l'étude précédente à *Salmonella* et à Coxsackievirus, sur la base des comptages de CT et coliphages pour les opérations d'épandage et de chargement de boues solides, et faisant varier les ratios germes/indicateurs de  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$  et la durée des opérations de 1 à 8 heures. Les risques sont calculés pour les riverains, sur la durée d'un an à raison de 6 jours de chargement ou épandage par an. Le modèle Béta-Poisson a été utilisé pour *salmonella* et le modèle exponentiel pour Coxsackievirus. Une analyse de sensibilité a été réalisée, qui montre le grand impact des paramètres du modèle sur les calculs de risque. Malgré des modèles dose-réponse différents et les nombreuses incertitudes, les risques calculés diffèrent peu entre *Salmonella* et le virus pour le même type d'exposition.
- l'étude générique anglaise (Gale, 2005), portant sur l'ingestion de végétaux cultivés sur sols amendés avec des boues non hygiénisées, pas même stabilisées, en respectant la réglementation en vigueur, avec des risques individuels allant de  $4,3 \cdot 10^{-5}$  pour *Giardia spp.* à  $7,5 \cdot 10^{-11}$  pour *E. coli* O157:H7. Cette étude porte sur 4 bactéries, 2 protozoaires et un virus pathogènes identifiés dans les eaux usées et les boues (cf. Tableau 2.8-2). Partant des données de concentrations dans les eaux usées, et des coefficients de répartition et de décroissance des germes disponibles dans la littérature, cette étude modélise l'évolution des concentrations en germes suite au traitement des eaux usées par digestion anaérobie mésophile (non hygiénisante), puis à l'épandage des boues, en respectant la réglementation britannique, sur des légumes racines consommés ensuite par la population britannique. Les doses consommées issues du modèle sont transformées en risques sanitaires par utilisation de fonctions dose-réponse pertinentes pour les différents germes. L'étude teste également l'impact de provisions réglementaires (intervalles entre épandages et récolte) et de problèmes de fonctionnement de la station d'épuration. Les incertitudes afférentes aux concentrations de pathogènes dans les eaux usées, aux transferts dans les différents milieux et aux fonctions dose-réponse sont discutées de manière uniquement qualitative. Cette étude est un bon exemple de démarque d'EQRS pour la consommation de végétaux ayant poussé sur sol amendé avec des boues d'épuration, de plus il concerne 6 pathogènes parmi les plus préoccupants et apporte beaucoup d'informations. L'étude manque cependant d'une étude quantitative de variabilité et d'incertitude.

- l'étude mexicaine (Navarro et al., 2009) portant sur l'ingestion de légumes cultivés sur des sols amendés par des boues au standard OMS pour les helminthes, avec des risques individuels (consommation hebdomadaire) compris entre  $10^{-2}$  et  $10^{-5}$ . Cette étude présente le grand mérite d'avoir élaboré un modèle dose-réponse pour l'ascaris, qui n'est pas présent en France métropolitaine mais est présent dans les DOM-TOM. Ce modèle a été construit sur la base de données épidémiologiques (prévalence de l'ascaris dans les populations exposées), de données de consommation de légumes, d'utilisation des boues et de concentration en œuf d'ascaris dans les boues. La fonction dose-réponse a été ensuite appliquée à un scénario d'utilisation de boue au standard OMS pour les helminthes. Les circonstances d'exposition sont spécifiques du Mexique (probablement de nombreuses populations pauvres épandant des boues non hygiénisées sur des parcelles maraîchères et fruitières) et ne peuvent donc pas être transposées dans le contexte des DOM-TOM français. L'auteur termine par une discussion de type coût-bénéfice entre le niveau de traitement des boues et le bénéfice sanitaire escompté pour les populations.

Certains de ces risques peuvent paraître relativement alarmants vis-à-vis des seuils d'intervention adoptés en matière de risque chimique ( $10^{-5}$  pour les effets sans seuil de dose), d'autant plus que les germes impliqués peuvent être à l'origine de maladies relativement graves (par exemple *E coli* O157:H7), même chez les sujets immunocompétents. De tels seuils d'intervention ne sont cependant pas appliqués de manière consensuelle en ce qui concerne le risque microbiologique (cf. chapitre 2.3.5)

L'apport des études épidémiologiques à la connaissance des risques associés à l'épandage de boue en population général semble inexistant, même si certaines études seraient en cours (US-EPA, 2008).

**Tableau 2.8-1 : Résultats d'EQRM sur populations générales liées à l'épandage de boues de station d'épuration (1)**

Pays	Population	Activité d'exposition	Agent	Type de boue	Méthodologie	Risque infectieux individuel	Référence
France (étude générique)	Générale	Consommation toute l'année exclusive de pommes de terre ayant poussé sur une parcelle amendée	Prion	Non spécifié	Sélection des agents pathogènes pertinents et de leur fonction dose réponse, Estimation des concentrations d'après bibliographie ou chaîne d'hypothèses. Détermination des coef. de transfert, décroissance, consommation d'après biblio ou à dire d'expert. Modélisation des transferts Calcul des doses ingérés et des risques correspondants	7,3 10 <sup>-13</sup>	INERIS 2007b
France (étude générique)	Riveraine	Consommation pendant 1 mois de végétaux provenant d'un jardin ayant subi les retombées d'aérosol de boues + ingestion de poussière pendant activité de jardinage	<i>Salmonella spp.</i>	Non spécifié		1,8 10 <sup>-2</sup>	INERIS 2007b
			<i>E. coli</i> O157:H7	Non spécifié		2,1 10 <sup>-4</sup>	INERIS 2007b
			<i>Cryptosporidium parvum</i>	Non spécifié		4,4 10 <sup>-3</sup>	INERIS 2007b
France (étude générique)	Riveraine	Consommation pendant 1 mois de légumes racines provenant d'un jardin contaminé par l'érosion du sol amendé d'une parcelle voisine + ingestion de poussière pendant activité de jardinage. Pour les prions : en +, consommation de pommes de terres cultivées sur parcelle amendée avec boues contaminées	Prion	Non spécifié		1,3 10 <sup>-12</sup>	INERIS 2007b
			<i>Salmonella spp.</i>	Non spécifié		7,3 10 <sup>-9</sup>	INERIS 2007b
			<i>Cryptosporidium parvum</i>	Non spécifié		9,8 10 <sup>-9</sup>	INERIS 2007b
			<i>E. coli</i> O157:H7	Non spécifié		4,4 10 <sup>-10</sup>	INERIS 2007b
			Prion	Non spécifié		1,1 10 <sup>-17</sup>	INERIS 2007b
Etats-Unis (1 site)	Riveraine	Inhalation 6 jours par an d'aérosol provenant d'un épandage de boue sur une parcelle située à 30,5 m au vent du lieu de résidence	Coxsackievirus A 21	Boue liquide		Expérience aux champs avec épandeur de boue liquide enrichie en <i>E. coli</i> et coliphages MS2. Capteurs d'aérosols et comptage des germes. Modèle de dispersion linéaire des coliphages. Application pour calculer le risque attribuable à Coxsackievirus	7 10 <sup>-7</sup> à 7 10 <sup>-5</sup> (*)
Etats-Unis (10 sites)	Riveraine	Inhalation 6 jours par an d'aérosol provenant d'un épandage de boue sur une parcelle située à 30,5 m au vent du lieu de résidence	Coxsackievirus A 21	Boues pâteuses	Prélèvement et comptage de germes sur 10 sites de manipulation ou épandage de boues liquides ou solides. Utilisation de Coliformes comme marqueur des bactéries et coliphages comme marqueur de virus. Utilisation du modèle de l'étude précédente pour le calcul de risque pour Salmonella et Coxsackievirus	2,1 10 <sup>-4</sup> à 2,1 10 <sup>-6</sup> (*)	Brooks et al., 2005b
			<i>Salmonella spp.</i>	Boues pâteuses		3,6 10 <sup>-7</sup> à 3,6 10 <sup>-9</sup> (*)	Brooks et al., 2005b
Etats-Unis (10 sites)	Riveraine	Inhalation 6 jours par an d'aérosol provenant d'un chargement de boue sur une parcelle située à 30,5 m au vent du lieu de résidence	Coxsackievirus A 21	Boues pâteuses	3,8 10 <sup>-4</sup> à 3,8 10 <sup>-6</sup> (*)	Brooks et al., 2005b	
			<i>Salmonella spp.</i>	Boues pâteuses	1,4 10 <sup>-4</sup> à 1,4 10 <sup>-6</sup> (*)	Brooks et al., 2005b	

(\*) : selon le ratio indicateur/pathogène



Tableau 2.8-2 : Résultats d'EQRM sur populations générales liées à l'épandage de boues de station d'épuration (2)

Pays	Population	Activité d'exposition	Agent	Type de boue	Méthodologie	Risque infectieux individuel	Référence
Royaume-Uni (étude générique)	Générale	Consommation pendant 1 an de végétaux cultivés sur sol amendé avec les boues non traitées, en respectant les restrictions d'épandage en vigueur	<i>Salmonella spp.</i>	Boue brute non stabilisée	A partir des données de concentration dans les eaux usées, et les coefficients de répartition et de décroissance des germes disponibles dans la littérature, modélisation de l'évolution des concentrations en germes suite au traitement des eaux usées par digestion anaérobie mésophile (non hygiénisante), puis à l'épandage des boues, en respectant la réglementation britannique, sur des légumes racines. Utilisation des modèles dose- réponse des différents germes pour convertir les doses consommées en risque sanitaire.	$7,9 \cdot 10^{-9}$	Gale, 2005
			<i>Listeria monocytogenes</i>	Boue brute non stabilisée		$1,1 \cdot 10^{-8}$	Gale, 2005
			<i>Cryptosporidium spp.</i>	Boue brute non stabilisée		$4,2 \cdot 10^{-7}$	Gale, 2005
			<i>Giardia spp.</i>	Boue brute non stabilisée		$4,3 \cdot 10^{-5}$	Gale, 2005
			<i>E. coli</i> O157:H7	Boue brute non stabilisée		$7,5 \cdot 10^{-11}$	Gale, 2005
			<i>Campylobacter spp.</i>	Boue brute non stabilisée		$5,5 \cdot 10^{-7}$	Gale, 2005
			Enterovirus	Boue brute non stabilisée		$1,8 \cdot 10^{-9}$	Gale, 2005
Mexique (étude générique)	Générale	Consommation pendant une semaine de carottes cultivées sur une parcelle amendé avec des boues au standard OMS (1 œuf /g) avec élimination de 99% des œufs par lavage	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Boues conforme aux normes OMS pour helminthes (1 œuf /g MS)	Construction d'un modèle dose réponse pour l'ascaris sur la base de données épidémiologiques (prévalence de l'ascaris dans les populations exposées, de données de consommation de légumes et d'utilisation des boues et de concentration des boues en œuf d'ascaris ; Application du modèle au risque lié à l'utilisation de boues aux normes OMS.	$9,0 \cdot 10^{-5}$ à $5,9 \cdot 10^{-4}$ (**)	Navarro et al., 2009
Mexique (étude générique)	Générale	Consommation pendant une semaine d'épinards cultivées sur une parcelle amendé avec des boues au standard OMS (1 œuf /g) avec élimination de 99% des œufs par lavage	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Boues conforme aux normes OMS pour helminthes (1 œuf /g MS)		$1,8 \cdot 10^{-3}$ à $1,5 \cdot 10^{-2}$ (**)	Navarro et al., 2009

(\*\*) : selon consommation de légumes

## **2.9. ANALYSE CRITIQUE DE L'ÉTUDE INERIS : « BASES SCIENTIFIQUES POUR L'ÉVALUATION DES RISQUES SANITAIRES RELATIFS AUX AGENTS PATHOGÈNES » (CONVENTION ADEME/SYPREA/FP2E/INERIS, 2007)**

Le rapport « Bases scientifiques pour l'évaluation des risques sanitaires relatifs aux agents pathogènes » (INERIS, 2007b) effectué dans le cadre d'une convention sur « l'évaluation des risques sanitaires des filières d'épandage des boues de station d'épuration » est disponible sur le site de l'INERIS. Ce rapport de 172 pages fait état a priori de la seule EQRM réalisée en France, appliquée aux déchets, plus particulièrement aux boues de station d'épuration épandues sur les parcelles agricoles. Il ne s'agit pas en fait d'une EQRM suscitée par la survenue d'un évènement sanitaire particulier, mais plutôt d'un exercice basé sur des hypothèses génériques concernant les risques liés à l'épandage de boues non hygiénisées pour les agriculteurs et les riverains. Il faut noter que cette étude est un travail collectif ayant fait intervenir de nombreux spécialistes et qui s'est déroulée sur une période relativement longue.

L'analyse « critique » présentée ci-après a été réalisée sur l'unique base de la lecture du rapport d'octobre 2007, sans entretien avec les rédacteurs, ni réexamen des références bibliographiques citées. Les calculs numériques n'ont pas été non plus revérifiés.

### **2.9.1. IDENTIFICATION DU DANGER**

Cette étape consiste en la sélection d'organismes pathogènes d'intérêt sanitaire. Les agents chimiques d'origine biologique (endotoxines, par exemple) sont écartés de l'étude, sans doute avec raison, mais sans que ce choix ne soit justifié.

Le choix des agents se fait sur la base d'une étude bibliographique très fournie avec références françaises, américaines et britanniques en appliquant :

- les critères de pertinence :

- présence dans les boues ou les eaux usées urbaines, d'abattoirs ou agricoles.
- résistance aux traitements de boues : ce critère peut sembler peu justifié dans la mesure où il est précisé que les boues de petites stations d'épuration ne subissent pas de traitement (si ce n'est physique). Les boues non hygiénisées des stations de tailles moyenne ou élevée subissent souvent une stabilisation mésophile (température ordinaire) aérobie ou anaérobie, où les conditions d'écologie microbienne peuvent en effet diminuer les populations de pathogènes, en particulier les bactéries et les virus, mais moins les kystes de protozoaires et encore moins les œufs d'helminthe. Le critère de résistance aux traitements des eaux usées (décantation fine et abatement de la matière organique par boues activées, chenaux d'oxydation, filtres bactériens ou autres) n'est pas pris en compte, mais l'importance de ce critère est relative.
- survie des agents pathogènes dans l'environnement.
- potentiel d'exposition des populations : il est fait distinction entre les opérateurs (d'épandage) dont les risques se rapportent au cadre de la santé professionnelle et des agriculteurs dont les risques se rapportent au cadre de la santé publique. Ce clivage est surprenant dans la mesure où des agriculteurs peuvent a priori épandre leurs boues eux même sur leurs parcelles et il ne semble pas que la MSA distingue les opérations d'épandage et d'enfouissement des boues.

- et ceux de faisabilité :

- données de contamination représentatives de la réalité française, c'est-à-dire la disponibilité de données de concentrations dans les boues ou d'hypothèses permettant d'estimer ces concentrations. Ce critère est très sélectif étant donné le peu de données disponibles en France. Il aurait peut-être été opportun de rechercher des données issues de pays

comparables à la France de ce point de vue, mais les critères de « comparabilité » sont peut-être difficiles à définir.

- existence d'une relation dose-réponse. Ce critère est également très sélectif et peut-être aurait-il fallu commencer par lui pour limiter le travail de synthèse bibliographique, qui demeure cependant fort utile pour d'autres études. Le choix de la voie d'exposition se fait à ce niveau : seule la voie orale est retenue faute de relation dose-réponse disponible pour l'inhalation, en dehors du Coxsackievirus dont l'étude de référence élaborant la fonction dose-réponse n'a pu être retrouvée, donc évaluée. Cette fonction dose-réponse est néanmoins citée dans deux publications de 2005 et dans une revue de référence signée par 6 auteurs dont 5 font autorité dans ce domaine (J.P. Brooks, G.D Tanner, C.P. Gerba, C.N. Haas et I.L. Pepper) : le « bénéfice du doute » aurait pu lui être accordé, au moins avec réserve. Il se peut néanmoins que ces publications soient postérieures à l'arrêt de recherche bibliographique car elles ne sont pas citées dans le rapport. D'autre part, un mode d'exposition pris en compte dans l'étude sera l'ingestion de poussières en suspension dans l'air : certains auteurs considèrent cela comme une exposition par inhalation.

L'application des critères, en particulier des deux derniers, aboutit à une liste de 12 pathogènes dont seulement 4 sont finalement retenus (Entérovirus, *Salmonella spp.*, *E. coli* O157:H7 et *Cryptosporidium spp.*) auxquels est ajouté le prion, qui est traité à part. L'exclusion de chacun des 8 pathogènes non retenus est clairement justifiée.

Chacun des quatre agents pathogènes retenus fait l'objet d'une fiche où sont décrits ses effets potentiels sur la santé.

## 2.9.2. SÉLECTION DES FONCTIONS DOSE-RÉPONSE

Pour chaque pathogène, les fonctions dose-réponse disponibles décrivant la probabilité d'infection en fonction de la dose (sans seuil) sont identifiées, puis une seule de chaque est sélectionnée selon un raisonnement clairement exposé. Il faut noter que les critères de sélection ne sont pas donnés a priori.

Quelques paragraphes sont consacrés à la variabilité inhérente à l'élaboration des fonctions dose-réponse, mais seulement à titre informatif.

Les justifications des choix des fonctions dose-réponse reposent plus sur des critères de fiabilité, d'actualisation ou de consensus que sur des critères de protection de la santé (principe de prudence).

Les « limites de validité » (qualitatives, relativement à leur variabilité inhérente et aux incertitudes qu'elles portent) des fonctions dose-réponse sélectionnées sont clairement exposées.

## 2.9.3. ESTIMATION DES EXPOSITIONS

### 2.9.3.1. Concentrations de pathogènes dans les boues

Le niveau de contamination des boues pour chaque pathogène est déterminé sur la base :

- soit de mesures réalisées en France : Entérovirus, Salmonella, Cryptosporidium le nombre de campagnes de mesures étant relativement réduit (1 pour Entérovirus, 3 pour Salmonella et pour Cryptosporidium). Les valeurs moyennes de concentrations sont retenues sans coefficient de variation,
- soit d'une chaîne d'hypothèses (*E. coli* O157:H7) en considérant les fèces de bovins abattus comme unique source de contamination. Là également, l'estimation porte sur une concentration moyenne sans étude de variabilité ni d'incertitude.

En toute rigueur, le cas des boues hygiénisées (par exemple par chaulage) aurait également pu être évoqué en leur attribuant une concentration en pathogènes (au moins pour les bactéries et virus) égale, par exemple, à 50 % du seuil de détection et il aurait fallu vérifier que la réglementation (ou les « bonnes pratiques »), moins restrictive, permette toujours une réduction du risque à un niveau acceptable.

### 2.9.3.2. Schémas conceptuels et scénarios d'exposition

La sélection des scénarios d'exposition pertinents (associés aux schémas conceptuels correspondants) est réalisée à partir de la liste exhaustive établie par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) en 1998. La sélection se fait par élimination sur la base de la pertinence, notamment vis-à-vis de la législation en vigueur sur les épandages, et de la faisabilité (informations disponibles).

L'élimination des hypothèses de consommation de produits végétaux ayant poussé sur sols amendés est clairement justifiée. L'élimination de la contamination possible des eaux de surface est argumentée par l'absence de modèle de transferts de microorganismes vers ces eaux. Par contre, il n'est pas mentionnée qu'il existe des modélisations de transferts des particules de sols (susceptibles de contenir des pathogènes) par ruissellement pluvial au sein des bassins versants et il aurait été profitable d'utiliser ces modèles pour montrer, en les croisant avec les données sur la survie des germes, que le risque lié aux eaux superficielles (baignade, arrosage) était négligeable une fois appliquée la législation.

Les trois scénarios sélectionnés : (1) agriculteur ingérant les poussières de sol amendé lors de l'enfouissement, (2) riverain consommant des légumes contaminés par retombées atmosphériques de boues épandues sur le champ voisin et (3) riverain consommant des légumes contaminés par érosion et transport vers sa parcelle, de boues épandues sur le champ voisin, sont modélisés ensuite manuellement.

Le scénario d'exposition de l'agriculteur est par la suite scindé en deux sous-scénarios : (1a) exposition lors de l'enfouissement des boues 24 heures après l'épandage et (1b) exposition au moment du labour, 1 mois après l'épandage ; l'exposition de l'agriculteur est considérée unique sur 8 heures et l'exposition du riverain répétées 8 heures par jour sur 1 mois.

Si de nombreux paramètres de transfert/survie/consommation utilisés dans la modélisation font référence à des données bibliographiques, certains paramètres, sont donnés « à dire d'expert » et de ce fait porteurs d'incertitudes importantes. Ces paramètres concernent en particulier les « facteurs d'émission » des germes depuis la parcelle par transport aérien ou transport hydrique. Il est regrettable que les acquis de la modélisation de transport particules de sol, soit dans l'air par les modèles de dispersion atmosphérique, soit dans l'eau par les modèles d'érosion de sol, n'aient pas été exploités ne serait-ce que pour valider, encadrer ou réduire les incertitudes associées aux paramètres.

Si la plupart des paramètres se voient attribuer une valeur unique, le taux de décroissance des germes dans le sol est caractérisé par une valeur minimale et une valeur maximale

### 2.9.4. CARACTÉRISATION DU RISQUE

Les doses ingérées (germes/jour) montrent des variations très importantes selon les germes, les scénarios et surtout les taux de décroissance dans les sols. Ces variations se répercutent assez logiquement sur les risques calculés.

Quel que soit le germe, le risque maximal d'infection correspond au scénario 2 (exposition répétée sur 1 mois), suivis des scénarios 1a, 1b, inférieurs au scénario 2 d'environ 1 ordre de grandeur. Le scénario 3 présente le risque minimal, généralement 4 à 5 ordres de grandeur sous le scénario 2.

En première approche, il est constaté que ce sont les scénarios faisant intervenir le transport aérien des germes qui génèrent le plus de risque, or ce sont ceux également qui présentent a priori le plus haut niveau d'incertitude à cause du facteur d'émission (taux de dispersion des boues sous forme d'aérosols) donné, en partie pour le scénario 2, à dire d'expert, sans plus de justification. Ce constat, repris à juste titre dans le chapitre consacré à la discussion des résultats, relance l'intérêt d'un approfondissement de la recherche, notamment des apports de la modélisation de dispersion atmosphérique, dans ce domaine.

Pour le scénario de risque maximal (scénario 2 avec exposition répétée sur 1 mois), les risques sont, dans l'ordre décroissant :  $2 \cdot 10^{-1}$  pour Entérovirus,  $1,8 \cdot 10^{-2}$  pour Salmonella,  $4,4 \cdot 10^{-3}$  pour Cryptosporidium et  $2,1 \cdot 10^{-4}$  pour *E. coli* O157:H7. Ces niveaux de risque, surtout pour Entérovirus et

Salmonella, sont donc préoccupants par rapport aux risques généralement rencontrés pour les substances chimiques émises par des ICPE.

Le chapitre consacré à la discussion des résultats passe en revue les nombreuses incertitudes afférentes aux hypothèses retenues pour les calculs des expositions et des risques. Des analyses de sensibilité sont réalisées individuellement pour certains paramètres importants : concentrations dans les boues, relation dose-réponse, quantités de poussières ingérées, régime alimentaire. Certaines hypothèses majorant le risque comme la non prise en compte de la décroissance des germes pendant les transferts ou le stockage des boues ne sont pas testées. Force est de constater que l'adoption de valeurs maximisées ne produit que des effets nuls ou modérés, en dehors de la comparaison cabine de tracteur ouverte/cabine fermée pour l'agriculteur enfouissant les boues. Ce constat n'est cependant pas exploité par les auteurs dans le but de renforcer la validité des résultats. Il n'a pas été fait de calcul « cumulé » des incertitudes, ni d'étude de variabilité par simulation de Monte Carlo.

Les auteurs ne jugent pas nécessaire d'exposer les résultats numériques, même sous forme très synthétiques, tel que le tableau 26 de l'annexe B, dans le corps principal du rapport, en les laissant cependant de manière transparente dans l'annexe B. Les conclusions portées dans le corps principal rappellent les très faibles doses de germes mises en jeu et présentent une hiérarchisation des scénarios et des germes en termes de risque sanitaire encouru.

La dernière phase mentionne l'impossibilité dans l'état des connaissances actuelles de quantifier les incertitudes afférentes à l'étude en arguant que les taux de survie et les fonctions dose-réponse des germes ne sont pas disponibles spécifiquement pour la matrice boue. S'il est vrai dans l'absolu, ce type d'argument n'est pas jugé irréductible dans de nombreuses publications d'évaluation de risques liés aux bioaérosols ou à l'épandage de boues.

### **2.9.5. ETUDE DU RISQUE ASSOCIÉ AUX PRIONS**

Une étude analogue est faite pour le prion selon les étapes suivantes :

- concentration dans les boues issue d'une chaîne d'hypothèses
- fonction dose-réponse basée sur une  $DI_{50}$  (dose infectieuse à 50 %)
- scénarios d'exposition identiques à ceux des agents conventionnels étudiés plus haut avec en plus le scénario du pire cas, soit la consommation pendant 1 an de pommes de terre provenant d'une parcelle amendée

Le risque maximal obtenu est de l'ordre de  $10^{-12}$ , donc jugé acceptable.

Contrairement au cas des agents conventionnels, aucune réserve n'est faite concernant les incertitudes afférentes à l'étude sur les prions.

### **2.9.6. CONCLUSION**

Les conclusions portées dans le rapport principal sont que l'état des connaissances actuels ne permet pas d'estimer le risque lié à l'épandage des boues non hygiénisées et qu'il n'est donc pertinent de proposer une évaluation quantitative des risques dans le cadre d'une autorisation d'épandage mais d'envisager une approche qualitative.

Il peut sembler dommage, au vu de l'ampleur du travail accompli, qu'une conclusion aussi tranchée soit induite par le manque de validité d'un facteur d'émission sans avoir essayé d'investiguer plus en profondeur sur la détermination de ce facteur. Il est étonnant que le modèle de dispersion de pathogènes suite à un épandage de boues liquides, développé dans une étude anglaise pourtant citée dans le rapport (Brooks, 2005a) n'est pas été exploité pour combler partiellement le manque d'information.

## 2.10. EVOLUTION DES PARADIGMES ET CADRES CONCEPTUELS DE L'ERM

Le cadre fixé pour l'évaluation du risque chimique par le National Research Council (NRC) des Etats-Unis en 1983 et adopté dans les pays occidentaux, notamment Etats-Unis et Union Européenne, et par les organisations internationales (FAO, OMS, Codex Alimentarius Council, etc.), a servi de base aux premières ERM. Les quatre étapes définies par le cadre NRC, que sont successivement l'identification des dangers, les relations dose-effet, l'estimation des expositions et la caractérisation du risque ont donc été appliquées aux ERM et plus précisément aux évaluations quantitative (EQRM). Très vite, il est apparu cependant que certaines spécificités, listées au prochain paragraphe, liées à la nature biologique des agents pathogènes et de leurs interactions avec le milieu extérieur et les organismes hôtes qu'ils sont susceptibles d'infecter rendaient peu pertinente l'application directe de certaines méthodes utilisées en évaluation du risque chimique.

Des approches plus ou moins « adaptées » du modèle NRC ont été pratiquées par différentes institutions sans toutefois dévier de manière significative du paradigme NRC et de la démarche à 4 étapes. Cependant, dans certaines études, il s'est avéré profitable, voire indispensable, d'ajouter un chapitre intitulé « définition du problème », préliminaire aux quatre étapes classiques. Cet ajout s'inspire en fait du modèle général de prise de décision prôné par P. Drucker en 2001 dans la *Harvard Business Review*, modèle en trois phases successives : (i) définition du problème, (ii) analyse et (iii) interprétation. Ainsi, dans l'ERM, la phase d'analyses comprend les trois étapes d'identification des dangers, de relation dose-réponse et d'estimation des expositions alors que la troisième phase (interprétation) est assimilée à la caractérisation du risque. En fait, la définition du problème ne doit pas se limiter, comme c'est souvent le cas dans les études du risque chimique, à une simple description du contexte et de l'objectif de l'étude, mais doit être vue comme une étape à part entière de l'évaluation qui décidera des objets étudiés (agents pathogènes, matrices, voie d'exposition, etc.) et des méthodes utilisées dans les étapes suivantes. Il comprend généralement une description claire du domaine d'intervention et de l'envergure de l'étude (par exemple, zone géographique et population concernée), un exposé des motifs avec la liste des questions posées par les décideurs, le contexte réglementaire, environnemental et ou social, les principaux facteurs et problèmes à prendre en compte, et les résultats escomptés de l'évaluation.

Un cadre révisé pour la conduite d'une ERM a été proposé en 2000 par l'ILSI (International Life Science Institute, Washington), en collaboration avec le Département Eau de l'US-EPA. Ce nouveau cadre s'inspire de la démarche décisionnelle en 3 phases, à savoir :

- la phase de définition du problème, rebaptisée « formulation du problème » (*problem formulation*)
- la phase de d'analyse, séparée en deux étapes : caractérisation de l'exposition et caractérisation des effets sur la santé humaine
- la phase d'interprétation, appelée caractérisation du risque comme dans le cadre classique d'évaluation du risque.

La phase de formulation du problème du modèle ILSI comprend, outre les composantes décrites plus haut pour la définition du problème, un modèle conceptuel (ou schéma conceptuel) qui décrira les interactions agent pathogène étudié-population cible au sein d'un scénario d'exposition défini. Une caractérisation préliminaire de l'exposition et des effets sanitaires peut être réalisée à ce stade, ainsi que la description du ou des agent(s) pathogène(s) et de ses caractéristiques pathologiques (virulence, mécanismes d'infection). Le scénario et les médias d'exposition étudiés seront également définis, ainsi que les possibilités d'infection secondaires (personne à personne). Il s'agit en fait d'une évaluation préliminaire qui permettra d'identifier l'ensemble des données nécessaires et les manques et insuffisances éventuelles parmi ces données, qu'il faudra compenser. Les aspects réglementaires seront également exposés afin d'une part, de mieux cerner les probabilités de présence d'agents pathogènes une fois la réglementation appliquée et d'autre part, de connaître les outils disponibles à renforcer, modifier ou remplacer pour ultérieurement diminuer les risques sanitaires étudiés. Cette phase doit être conduite avec consultation de l'ensemble des parties prenantes (autorités, opérateurs, consommateurs, riverains et autres).

L'étape de caractérisation de l'exposition du modèle ILSI doit aboutir à un profil d'exposition sur la base des trois composantes suivantes à documenter en détail :

- la caractérisation de l'agent pathogène, qui peut renseigner sur la virulence et le caractère pathogène, les effets sanitaires ou maladies causées par l'agent, la survie et la multiplication de l'agent dans les différents milieux et sa résistance aux différents traitements et procédés, la spécificité à l'hôte, le mécanisme infectieux, la voie et la porte d'entrée de l'agent dans l'hôte, le potentiel de dissémination secondaire, les différentes souches existantes (si l'agent est étudié au niveau de l'espèce) et l'écologie générale de l'agent.
- la détermination de l'occurrence de l'agent, qui se fait sur la base de tout ou partie des données suivantes : concentration dans l'environnement et variations temporelles, distribution spatiale (agrégation, agglutination sur les particules, etc.), niches écologiques et réservoirs naturels, influence du climat et des saisons sur la survie ou la multiplication, description et fiabilité des traitements visant à détruire l'agent, indicateurs de présence et existence d'agents de substitution (caractéristiques similaires mais mieux étudiés). Les limites et incertitudes liées à ces données doivent être décrites.
- l'analyse détaillée de l'exposition, qui comprend l'identification des différents médias d'exposition, la ou les voies d'exposition pertinentes, la taille et la structure démographique de la population exposée, la nature spatiale et temporelle de l'exposition, exposition répétée ou non, le comportement de la population exposée et les possibilités de re-contamination.

L'étape de caractérisation des effets sur la santé humaine doit, selon le modèle ILSI, aboutir à un profil hôte-pathogène sur la base des trois composantes suivantes :

- la caractérisation des hôtes, qui peut rendre compte de l'âge, du statut immunitaire, des maladies préexistantes et des traitements médicaux y afférents, du terrain génétique, de l'état de grossesse éventuel, le statut nutritionnel et les caractéristiques sociales et comportementales,
- les effets sanitaires, qui renseignent sur la durée de la maladie et sa sévérité, les séquelles éventuelles à long terme et l'impact sur la qualité de la vie, son statut épidémiologique (morbidité et la mortalité), le taux de transmission secondaire,
- l'analyse de la fonction dose-réponse, qui décrit l'existence des éléments suivants : modèles statistiques de fonction dose-réponse, sur l'humain ou sur l'animal, données épidémiologiques exploitables (toxi-infections collectives, épidémies, études d'intervention) et qui intègre les données recueillies pour les composantes précédentes afin de choisir/construire le modèle dose-réponse le plus pertinent. Les aspects liés à la variabilité et aux incertitudes devront bien entendu être traités, par exemple par des simulations de Monte-Carlo.

La phase de caractérisation du risque du modèle ILSI doit permettre, dans l'idéal d'évaluer les conséquences sanitaires du ou des scénario(s) d'exposition retenu(s), de caractériser le degré de confiance des estimations compte tenu de la variabilité et des incertitudes et éventuellement de procéder à une analyse de sensibilité aux principaux paramètres du modèle. L'aide à la décision pourra être complétée par l'évaluation de l'influence des mesures de gestion possibles sur les risques engendrés et finalement l'évaluation comparée des stratégies alternatives de gestion du risque.

Malgré l'aspect exhaustif et particulièrement adéquat de la démarche prônée par l'ILSI, une étude récente de l'US-EPA (2008) montrait que la démarche n'avait pas encore été développée *in extenso* par les institutions de référence.

## **2.11. COMPARAISON DES APPROCHES D'ÉVALUATION QUANTITATIVE DU RISQUE MICROBIOLOGIQUE ET DU RISQUE CHIMIQUE**

### **2.11.1. RAPPEL DES SPÉCIFICITÉS DU RISQUE MICROBIOLOGIQUE PAR RAPPORT AU RISQUE CHIMIQUE**

Les différences inhérentes aux agents biologiques en comparaison des agents chimiques concernent (i) les propriétés biologiques des agents en tant que tels, (ii) leur répartition et comportement dans les

différents média, (iii) la nature de leurs interactions avec l'organisme hôte (être humain) et (iv) la manière d'appréhender l'exposition à ces agents.

Les principales spécificités liées à la nature biologiques des microorganismes sont les suivantes :

- les microorganismes peuvent s'auto-répliquer : un seul microorganisme ne peut généralement produire d'effet sanitaire, contrairement à la population nombreuse que peut produire sa multiplication.
- la multiplication des microorganismes est influencée par les conditions écologiques qu'ils rencontrent en passant d'un milieu à un autre (eaux usées, boues, sols, organes végétaux) et divers traitements (épuration, désinfection, etc.) peuvent atténuer la viabilité d'un microorganisme de sorte qu'il ne soit plus nuisible une fois en contact avec un organisme hôte.
- les différentes souches d'une même espèce peuvent présenter des virulences, et donc des fonctions dose-réponse, très variées. Cela s'applique non seulement aux bactéries et aux virus, mais également aux protozoaires tels que *Cryptosporidium parvum*.
- pour une même souche, la virulence peut évoluer, et même s'atténuer fortement, en passant d'un hôte à un autre, ce qui explique l'arrêt de certaines épidémies.
- la détection et le dénombrement des microorganismes sont souvent difficiles et peuvent rarement être réalisés in situ. Durant le transport des échantillons vers le laboratoire, des modifications (perte ou multiplication) peuvent intervenir susceptibles de fausser les résultats.

Les principales spécificités liées à la répartition des microorganismes sont les suivantes :

- les microorganismes ne sont pas en général répartis de manière homogène dans les différents milieux, que ces milieux soient solides (boues, sols, viande, etc.), liquides (eaux usées, eau de boisson, lait, etc.) ou gazeux (air intérieur, air extérieur, etc.), ce qui peut entraîner des problèmes d'échantillonnage pour la quantification.
- les conditions environnementales influent sur la survie des microorganismes, surtout si ceux-ci sont pourvus de formes de résistance (endospores bactériennes, kyste de protozoaire, etc.).
- certains microorganismes présentent des hôtes intermédiaires (insectes vecteurs, par exemple), jouant un rôle primordial dans la transmission à l'homme.
- les microorganismes sont sensibles à certains traitements éradicateurs tels que la chloration qui a montrée son efficacité à travers le monde ou l'irradiation (ces techniques peuvent cependant présenter des inconvénients secondaires tels que de la génération d'organochlorés)

Les principales spécificités liées aux interactions avec les organismes hôtes sont les suivantes :

- la sensibilité des hôtes à l'infection ne dépend pas seulement de leur état général de santé, mais également de leur statut immunitaire et de leurs expositions antérieures à d'autres agents infectieux. D'autre part, les populations humaines du globe ne présentent pas une distribution homogène des statuts immunitaires et peuvent donc présenter des proportions différentes de porteurs sains (démonstré pour *Campylobacter jejuni*).
- parmi les populations plus particulièrement vulnérables aux infections, on compte les enfants, les personnes âgées, les personnes atteintes de malnutrition, les personnes immunodéprimées en particulier à cause du VIH ou d'une chimiothérapie.
- les infections secondaires sont possibles et influencées par la persistance du microorganisme dans les individus infectés.
- les aspects sociaux peuvent être également importants car ils conditionnent l'accès aux soins de bonne qualité et diminuent parfois les niveaux d'hygiène (surpopulation, propreté, etc.).
- les pratiques sanitaires telles que les vaccinations peuvent diminuer significativement les niveaux et conséquences des infections.



Les principales spécificités liées à l'exposition sont les suivantes :

- le consensus actuel favorise l'hypothèse qu'une exposition unique à un seul microorganisme pathogène est suffisante pour déclencher une infection et des effets néfastes chez l'individu exposé, l'objectif étant de déterminer la probabilité de l'infection et de l'apparition d'effet. Bien que cette hypothèse puisse être contredite dans certains cas, c'est bien l'approche sans seuil qui est privilégiée.
- chaque épisode d'exposition à un risque microbiologique est considéré comme indépendant et non cumulatif. Cette approche demeure inchangée, même dans le cas d'expositions répétées (consommation d'un aliment contaminé pendant plusieurs jours, par exemple), faute d'outils méthodologiques disponibles.
- une ou plusieurs expositions peuvent induire une immunité acquise à l'agent infectieux, selon des mécanismes encore peu connus aujourd'hui.

### **2.11.2. SYNTHÈSE COMPARATIVE DES APPROCHES D'ÉVALUATION DE RISQUE MICROBIOLOGIQUE ET CHIMIQUE**

La synthèse des résultats de la présente étude est présentée dans les tableaux suivants comparativement aux approches utilisées dans le cadre de l'évaluation quantitative du risque sanitaire (EQRS) chimique, en particulier l'approche recommandée pour les Dossiers d'autorisations d'exploiter des ICPE, pour laquelle il existe à présent un important retour d'expérience.

**Tableau 2.11-1 : Approches comparées des évaluations quantitatives de risque microbiologique et chimique (1)**

Phase/étape	Problématique	Approche Risque Microbiologique	Approche Risque Chimique (EQRS ICPE)	
Définition du problème	Choix des gents pathogènes	Un ou plusieurs agents sont retenus en fonction de leur probabilité d'occurrence dans les médias d'exposition et leur degré de pathogénicité. Très généralement, le nombre d'agents est réduit, parfois limité à un seul.  L'existence d'une fonction dose-réponse, pour l'agent ou un agent de substitution, n'est pas obligatoire dans le cas des études qualitative ou semi-quantitative	Le choix des substances toxiques à considérer est fixé par les guides spécifiques (INERIS, InVS, ASTEE, etc.), par les textes législatifs (émissions contrôlées des ICPE) ou d'après la connaissance de l'activité, du rejet polluant ou du milieu contaminé.  Dans la pratique, une substance est retenue pour l'EQRS si à la fois son facteur d'émission (ou sa concentration dans le milieu d'exposition) est connu et si une VTR (établie par une institution de référence) existe pour la voie d'exposition pertinente	
	Source d'émission de l'agent	Description détaillée de l'origine de l'agent pathogène et de son cheminement dans les différents média jusqu'à son contact avec l'organisme hôte.	Description de la source d'émission (cheminée d'installation classée, exutoire, etc.) et du devenir des polluant dans les différents milieux.	
	Objectifs et expression des résultats	Exposé clair de l'objectif et de l'expression des résultats de l'étude : risque d'infection (résultat minimal pour une approche quantitative), risque de développement d'une pathologie donnée, nombre de cas attendus.		Trois types de résultats possibles, pour chaque substance : - risque non quantifié d'apparition d'effets non cancérogènes, qui peuvent être divers et multiples en nature et en gravité, en fonction des doses/concentrations d'exposition - risque quantifié de développement de cancer, organe cible généralement connu mais parfois multiple, indice de gravité non prédictible - nombre de cas de cancers dans la population (multiplication des risques individuels par populations exposées)
		Evaluation préliminaire et modélisation (approche ILSI)		Evaluation préliminaire non requise
Identification des dangers	Caractérisation des agents pathogènes	Description des agents infectieux : groupe biologique, espèce, taille, mode de déplacement, mode de reproduction, souches (sérotipe)	Description des substances prises en compte, famille chimique (ex. COV, métaux lourds, etc.), propriétés physico-chimiques, état physique dans les circonstances de l'exposition (gazeux, particulaire, solide ou liquide) et spéciation éventuelle (ex : Cr III, Cr VI)	
		Ecologie et survie dans les différents médias concernés par l'étude	Dégradation possible par voie physico-chimique (photolyse, oxydation, réduction, réaction acide-base, etc.) et biologique (biodégradation dans les différents milieux)	
	Effets sanitaires	Effets sanitaires provoqués (généralement spécifiques de chaque agents/souche). Ces effets sont répartis en 4 groupes dans la classification sanitaire établie dans la directive Européenne 200/54/CE.	Description des principaux effets non cancérogènes et cancérogènes (génotoxiques ou épigénétiques) de chaque substance. Les substances sont classées en 4 groupes selon la probabilité de leurs effets cancérogènes pour l'homme.	
	Etudes de référence	Généralement sur l'humain, de type épidémiologique	Etudes sur l'humain parfois très limitées, recours important aux études animales de type toxicologique	
	Populations vulnérables	Immunodéprimés, malnutris, prédisposition génétique, femmes enceintes, enfants, vieillards	Insuffisant respiratoires, femmes enceintes, enfants, vieillards	
	Populations « protégées »	Immunité acquise après une ou plusieurs infections	Considération non ou peu pertinente pour le risque chimique	

Tableau 2.11-2 : Approches comparées des évaluations quantitatives de risque microbiologique et chimique (2)

Phase/étape	Problématique	Approche Risque Microbiologique	Approche Risque Chimique (EQRS ICPE)
Estimation des expositions	Quantification directe	Techniques classiques souvent longues et coûteuses, parfois peu spécifiques. Techniques modernes (génomique type PCR ou autres) plus rapides et beaucoup plus spécifiques, de plus en plus standardisées mais limites de détection parfois élevées. Mesures continues généralement impossibles	Techniques de mesurages fiables, précises et avec seuil de détection satisfaisant. Coût encore important pour certains composés (HAP, dioxine, etc.). Possibilité de mesures continues en émission ou concentration pour de nombreuses substances. Dosage séparé des spéciations encore peu fréquentes en routine, bien que techniquement réalisable.
	Prélèvements	Problèmes liés à la répartition hétérogène et « discrète » des agents dans les différents milieux : - air : volume à ajuster entre seuils d'insuffisance et de saturation, sauf pour les préleveurs de type impinger - milieu solide : nécessité fréquente d'un échantillonnage important avec poolage, homogénéisation - milieu liquide : nécessité fréquente de concentration de l'échantillon	Répartition homogène et prélèvements aisés dans l'air et en milieu liquide. Dans le cas des sols pollués, les prélèvements ne posent pas de problèmes bien que nécessitant des techniques d'extraction adaptées, mais l'hétérogénéité des concentrations est généralement importante (liées à la répartition spatiale des activités polluantes) et une approche géostatique est fréquemment requise.
	Schéma conceptuel : transferts des agents dans les milieux	Le transfert de microorganisme dans les différents compartiments fait généralement l'objet d'études au cas par cas, notamment pour les transferts air-sol, sol eaux de surface, sol-eaux souterraines, sols-plantes, sol-air. Les transferts se font par transport direct des germes ou par l'intermédiaire de particules auxquelles ils sont agglutinés (air-sol, sol-air, sol-eaux superficielles) ou par entraînement hydrique (sol-eaux souterraines, sol - eaux superficielles). Les cas de transfert de microorganismes pathogènes (salmonella, par ex.) vers l'intérieur des organes végétaux depuis le sol ou la surface des parties aériennes sont établis dans quelques rares articles avec quantification. Les transferts entre animaux (zoonoses) sont bien connus mais se font généralement par contamination externe (contact avec les excréments d'animaux infectés) et rarement par voie systémique. Les essais de modélisation sont rares et concernent surtout les transferts dans les eaux de surface ou les contaminations de produits animaux lors des opérations d'abattage et de conditionnement. Il n'existe pas a priori de modèles homologués et faisant l'objet d'un développement informatique et/ou d'une exploitation commerciale. Le recours au modèle de dispersion atmosphérique appliqué aux particules fines pour connaître les facteurs d'émission de bioaérosols est mentionné dans certaines publications.	Le transfert des substances dans les différents compartiments de l'environnement a, pour un certain nombre de substances, fait l'objet de très nombreux travaux qui ont abouti à l'existence de nombreux modèles de transferts multimédia, qui, à partir des concentrations des substances dans différentes couches de sols calculent les transferts dans les végétaux consommés (légumes racines et légumes feuilles), la chair des animaux d'élevage, le lait, les eaux de surface et les sédiments ainsi que la chair des poissons, l'eau de distribution, etc.. Ces modèles sont disponibles soit sous forme d'un ensemble d'équations (HHRAP de l'US-EPA) ou sous forme de logiciels (généralement tableurs) utilisables librement (Cal-Tox) ou commercialisés. Bien entendu, ces modèles nécessitent la connaissance des caractéristiques physico-chimiques des substances (parfois imputées dans le modèle) et les caractéristiques du sol (pH, teneur en argile, teneur en matières organiques, etc.). En amont de ces transferts à partir du sol, les transferts air-air et air-sol à partir de différentes sources d'émission aérienne, ponctuelles (cheminées) ou plus diffuses (piles de déchets, bâtiments et autres) sont quantifiables à l'aide de modèles de dispersion atmosphérique plus ou moins sophistiqués, de nature déterministe ou statistique, en fonction des données météorologiques particulière ou moyennes. Nombre de ces modèles sont commercialisés.

**Tableau 2.11-3 : Approches comparées des évaluations quantitatives de risque microbiologique et chimique (3)**

Phase/étape	Problématique	Approche Risque Microbiologique	Approche Risque Chimique ((EQRS ICPE)
Estimation des expositions (suite)	Schéma conceptuel : devenir des agents dans les différents compartiments de l'environnement	Les taux de survie de certains microorganismes dans certains milieux ont fait l'objet de certaines publications et de quelques synthèses. Seul un nombre limité de germes pathogènes et de milieux est concerné.	Le devenir des substances « dégradables » dans les différents milieux est renseigné dans certaines bases de données très denses de type HSBD (ou des synthèses plus structurées (monographies OMS, ATSDR, INERIS, etc.). Le niveau d'information varie selon les substances, les plus préoccupantes du point de vue de la santé ou de l'environnement étant généralement les mieux décrites.
	Unités de mesure	Unité classique : UFC pour les bactéries, UFP pour les virus, individus pour les protozoaires et œufs d'helminthes. Début d'utilisation d'unités génomiques pour la PCR quantitative	Unités de masse : mg, µg, utilisation persistante des ppm ou ppb pour les concentrations de certaines substances gazeuses
	Scénario d'exposition	Les comportements des populations cibles entraînant le contact avec les agents pathogènes doivent être décrits en terme qualitatifs et quantitatifs (fréquence, durée, quantités). Le scénario se base sur des moyennes statistiques (par exemple, volume inhalé ou quantité d'eau de boisson consommé par 24H, ou sur comportement maximisant le risque	L'approche est analogue mais nécessite généralement plus d'informations étant donné le caractère multimédia plus développé que pour le risque microbiologique. La constitution de budget espace-temps est souvent nécessaire pour estimer l'exposition par inhalation.
	Voie d'exposition	L'exposition par ingestion orale est largement prévalente, car les modèles dose-réponse ont été quasi exclusivement développés par cette voie. Seuls deux modèles existent pour l'exposition par inhalation (Coxsackievirus et B. anthracis), mais cette voie est souvent prise en compte en considérant que 10 % ou 50 % des particules inhalées sont ingérées. L'exposition par contact cutané ne semble pas avoir été traitée jusqu'à présent.	Les expositions par ingestion et par inhalation sont traitées de manière équivalente. L'exposition par contact cutané est souvent évoquée mais rarement traitée, faute de connaissance sur la relation dose réponse. Pour certaines substances, il arrive qu'une VTR orale soit utilisée pour évaluer l'exposition par contact cutané en utilisant un coefficient de transfert. Il arrive qu'une VTR inhalation soit dérivée d'une VTR orale ou vice versa à partir du volume inhalé moyen (20 m <sup>3</sup> /j) et du poids moyen de l'homme (70 kg), avec incorporation ou non d'un coefficient d'absorption. Cette pratique reste cependant exceptionnelle. La fraction ingérée des particules n'est généralement pas prise en compte.
	Facteurs d'émissions	Le facteur d'émission, ou plutôt la contamination initiale, est estimée au cas par cas sur la base de concentrations connues dans la source de contamination (par ex. boues d'épuration) et sa répartition dans les différents milieux. Dans certains cas, des mesures à certaines distances du point d'émission (par ex. asperseur), permettent, à l'aide d'un logiciel de dispersion, de calculer le facteur d'émission par calcul inverse.	Les facteurs d'émission des principales activités sont souvent présentés dans les bases de données spécialisées, telles que la base AP-42 de l'US-EPA sur les émissions atmosphériques, ou bien fournies par le constructeur. Les limites d'émission réglementaires peuvent également servir de point de départ en postulant que ces limites seront toujours respectées, ce qui n'est d'ailleurs généralement pas le cas, notamment lors des phases de redémarrage d'unités industrielles après arrêt pour cause de maintenance ou d'incident.

**Tableau 2.11-4 : Approches comparées des évaluations quantitatives de risque microbiologique et chimique (4)**

Phase/étape	Problématique	Approche Risque Microbiologique	Approche Risque Chimique (EQRS ICPE)
Estimation des expositions (suite)	Durée d'exposition	Chaque épisode d'exposition est considéré comme indépendant et instantané, même s'il peut s'étaler sur une certaine durée : consommation d'un plat, consommation journalière d'eau de boisson, inhalation de bioaérosols pendant la journée de travail d'une unité de compostage. Des expositions répétées, même avec un faible espacement, ne peuvent être cumulées, faute d'outils méthodologiques adéquats.	Il est fait distinction entre les expositions aiguë (< 14 jours pour l'ATSDR), répétée (OEHHA), sub-chronique ou intermédiaire (15 jours à 1 an), et chronique (> 1 an). Les modèles dose-réponse, notamment pour les effets à seuil, sont construits pour ces différentes durées
Relations dose réponse	Principe de base	Approche avec seuil (Dose Minimale Infectante) utilisée autrefois mais semble abandonnée.  Approche sans seuil d'effet seule adoptée pour le risque microbiologique : un seul germe pathogène peut induire une infection et, par la suite une maladie chez l'organisme-hôte. La fonction dose-réponse décrit la probabilité de survenue de ces événements en fonction de la dose.	Approche avec seuil pour les effets non cancérogènes et les effets épigénétiques : détermination d'un seuil sous lequel la survenue d'un effet sanitaire ne peut se produire (Valeur Toxicologique de Référence ou VTR).  Approche sans seuil pour les effets cancérogènes génotoxiques : une seule molécule de la substance peut provoquer un cancer. La fonction dose-réponse décrit la probabilité de survenue de du cancer en fonction de la dose. La VTR est la pente de la courbe.
	Modélisation, construction de la courbe dose réponse	Elaboration/sélection de modèles théoriques puis ajustement aux données expérimentales ou épidémiologiques et validation par le test du maximum de vraisemblance : détermination des paramètres du modèle.  Deux modèles d'ajustement généralement retenus pour le risque d'infection : - modèle Béta-Poisson, semble plus adapté aux bactéries $P = 1 - (1 + N/\beta)^{-\alpha}$ - modèle exponentiel, semble plus adapté aux virus et protozoaires $P = 1 - \exp(-N/k)$  Lorsque plusieurs fonctions dose-réponse sont disponibles : sélection selon des critères de qualité, d'analogie avec la situation étudiée et de protection de la santé (maximisation du risque).	Pour les effets cancérogènes : nombreux modèles d'ajustement et extrapolation aux faibles doses, le modèle multi-étape linéarisé étant le plus souvent retenu. Détermination de l'ERU (excès de risque unitaire) : pente de la courbe dose réponse aux faibles doses.  Pour les effets non cancérogènes : détermination à partir d'études expérimentales (animales) ou épidémiologiques, de doses remarquables : NOAEL ( <i>no observed adverse effect level</i> ) ou LOAEL ( <i>lowest observed adverse effect level</i> ) puis application de facteurs d'incertitude (facteurs de sécurité) pour déterminer une VTR.  Tendance à la convergence des approches avec et sans seuil pour les effets non cancérogènes : l'approche benchmark dose est de plus en plus fréquemment utilisée avec utilisation de l'ensemble de la courbe dose-réponse et détermination de la dose provoquant une variation remarquable (par ex. 5%) d'un effet sanitaire.  Quand plusieurs VTR sont disponibles, l'évaluateur les sélectionne selon divers critères : qualité/transparence de la démarche, date d'élaboration, étude de référence sur l'humain, valeur la plus protectrice, etc.

Tableau 2.11-5 : Approches comparées des évaluations quantitatives de risque microbiologique et chimique (5)

Phase/étape	Problématique	Approche Risque Microbiologique	Approche Risque Chimique (EQRS ICPE)
Caractérisation du risque	Expression des résultats : individu	Calcul du risque individuel (= probabilité d'infection) par application du modèle à la dose infectieuse (nombre de germes).	Effet cancérigène : ERI (excès de risque individuel) = ERU * dose = probabilité de développer un cancer sur une durée de vie entière Effet non cancérigène : QD (quotient de danger) = Dose/VTR. QD < 1 : prévient l'apparition de l'effet sanitaire, QD > 1 : apparition de l'effet ne peut être exclue
	Expression des résultats : population cible	Prise en compte des possibilités d'infection secondaire (personne à personne), par ex. par un modèle dynamique	Pas de transmission d'effets sanitaires de personne à personne
		Modélisation d'apparition de la maladie en fonction du statut sanitaire, immunitaire et « comportemental » des populations cibles. Détermination du nombre de cas par unité de temps (le plus souvent : année).	Pour effets cancérigènes seuls : détermination du nombre de cas par multiplication de l'ERU par l'effectif de la population sur la durée de vie entière. Pour les effets non cancérigènes : pas de calcul du risque collectif
	Seuil d'intervention (risque individuel)	Absence d'un seuil consensuel, étant donné le haut niveau préexistant des infections gastro-intestinales. Les niveaux de risque identifiés sont discutés au cas par cas, vis-à-vis des efforts et investissements nécessaires à leur réduction	Pour les effets cancérigènes : ERI < 10 <sup>-6</sup> : seuil consensuel international d'acceptabilité du risque, ERI >= 10 <sup>-5</sup> : généralement admis comme seuil d'intervention en France et à l'OMS ERI > = 10 <sup>-4</sup> : entraîne généralement une non autorisation du projet en France et aux USA.  Pour les effets non cancérigènes : QD < 1 : acceptable QD > 10 : refus d'autorisation (aux USA)
	Additivité des risques	Pas d'additivité des risques, possibilité d'immunité acquise suite à des infections répétées	Pour effets cancérigènes : somme des ERI pour l'ensemble des substances retenues Pour effets non cancérigènes : somme des QD par organe cible
	Prise en compte de la variabilité (inhérente au biologique) et des incertitudes (méconnaissance des phénomènes et des données réelles)	L'étude de variabilité et des incertitudes fait partie intégrante de l'évaluation et est notamment nécessaire aux aspects de communication des résultats.  Variabilité des paramètres du modèle retenu étudiée quasi systématiquement à l'aide de simulation de Monte Carlo.  Incertitudes généralement intégrées à la variabilité dans les premières études. Dans les nouvelles études, tendance à la dissociation avec simulation de Monte Carlo à 2 dimensions.	L'étude des incertitudes demeure très généralement qualitative ou semi-quantitative (facteurs de surestimation ou de sous-estimation du risque). Une étude de sensibilité des paramètres d'exposition est parfois réalisée  Exception : études de sols pollués avec traitement géostatistique et présentation des concentrations avec densité de probabilité.  L'étude de variabilité est rarement réalisée, bien qu'elle soit recommandée dans un référentiel méthodologique récent (InVS/AFSSET, 2007), notamment dans le cadre de la prédiction des cas de cancers dans la population exposée.

## 2.12. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

L'évaluation du risque microbiologique (ERM) est une discipline dont la démarche a été formalisée sur le modèle de l'évaluation de risque chimique, plus particulièrement sur l'évaluation quantitative de risque sanitaire, dont le déroulement en quatre étapes a été défini dans les années 80 par le National Research Council (NRC) des Etats-Unis.

Selon les connaissances disponibles, l'objectif et le mode d'expression des résultats recherchés, l'ERM peut être qualitative (catégorisation du risque par croisement de critères de probabilité et de gravité), semi-quantitative (classification plus fine et comparaison de différents risques) ou quantitative (EQRM : quantification du risque). C'est en particulier dans l'approche quantitative que l'analogie avec le risque chimique a été recherchée. Cependant, cette analogie est confrontée à certaines particularités des agents pathogènes infectieux (bactéries, virus, protozoaires, champignons, helminthes et prions) qui sont principalement :

- la faculté de s'auto-répliquer dans l'environnement et dans l'organisme,
- la forte dépendance aux conditions écologiques en matière de survie,
- la répartition hétérogène dans les différents milieux d'exposition,
- la difficulté d'identifier et de quantifier certains agents pour lesquels les techniques classiques basées sur l'isolement, la culture et l'observation sont bien souvent insuffisantes, d'autant plus que des agents de même espèce et même morphologie peuvent produire des effets sanitaires très différents en fonction de leur sérotype,
- la variation de vulnérabilité interindividuelle des humains à l'infection et au développement de maladies suite à l'infection, variabilité non seulement de nature génétique mais également de nature « historique » telle que la présence d'autres maladies ou le développement d'immunité suite à une infection préalable ou encore l'immunodéficience pour les individus atteints du VIH.

Les méthodes d'identification et de quantification des agents infectieux ont connu des avancées significatives durant les dernières décennies avec l'avènement et le développement des techniques d'amplifications géniques (PCR), qui permettent de gagner en spécificité et surtout en rapidité. Nombre de ces techniques sont néanmoins encore à perfectionner pour en améliorer les limites de détection et leur mise en œuvre dans les matrices complexes. D'autres techniques telles que les puces à ADN et les biocapteurs ouvrent des perspectives très prometteuses dans le domaine de la surveillance microbiologique de milieux.

Les transferts et la survie des germes dans les différents milieux ont fait l'objet d'études plus ou moins approfondies. Les transferts aériens de germes ont été relativement bien étudiés et ont fait l'objet de modélisations dans certaines conditions (plateforme de compostage, épandage de boues liquides). Les transferts au sein du sol, dans la zone non saturée semblent limités aux organismes de taille réduite (virus) mais dépendent logiquement de la texture des sols. Les transferts de germes pathogènes vers les végétaux se font principalement par dépôt d'aérosols sur les parties aériennes ou par contact entre le sol et les parties souterraines des végétaux. Dans ce dernier cas, on considère que le nettoyage des parties souterraines laisse subsister environ 10 % de terre adhérente. La pénétration de germes du sol vers les racines, puis leur migration depuis les racines vers les organes aériens a été démontrée expérimentalement pour certains pathogènes tels que *E. coli* et *Salmonella sp.*, mais les connaissances de ces transferts sont encore insuffisantes pour les estimer quantitativement.

Les fonctions dose-réponse, base de l'évaluation quantitative du risque, décrivent principalement le risque d'infection et non le risque de développement de maladie. Elles ont été principalement élaborées pour l'exposition par voie orale à divers pathogènes dont *E. coli*, *Salmonella non typhi*, entérovirus, *Cryptosporidium parvum* et *Ascaris lumbricoïdes*. Les fonctions dose-réponse « orales » peuvent être exploitées pour l'exposition aux aérosols en considérant qu'une fraction de l'aérosol inhalé est transférée vers l'appareil digestif par transport mucociliaire.

Eu égard à la nature biologique des agents, les concepts de variabilité (intrinsèque aux phénomènes biologiques) et d'incertitude (issue de la connaissance incomplète des phénomènes) sont essentiels

dans la caractérisation du risque et le recours aux techniques de simulation de type Monte-Carlo est très fréquent dans les EQRM approfondies.

Si les exemples d'EQRM sont relativement nombreux dans le domaine de la sécurité alimentaire (aliments et eaux de boisson), les EQRM appliqués à la filière déchets concernent essentiellement l'épandage de boue d'épuration et les plateformes de compostage des déchets, qui sont les principales sources d'exposition des populations générales. Lorsque qu'une exposition multimédia est envisagée, par exemple dans le cas d'épandage des boues, les incertitudes apparaissent notamment au niveau des coefficients de transfert entre milieux et de survie dans les différents milieux, fragilisant les résultats quantitatifs obtenus, comme c'est le cas de l'étude française sur l'épandage agricole de boues d'épuration non hygiénisées (INERIS, 2007b).

Les besoins en matière de recherche sur la problématique du risque microbiologique pour la population générale vis-à-vis de la filière déchets concernent en priorité le renforcement des connaissances permettant de réduire les incertitudes afférentes aux différentes étapes de l'EQRM et d'autre part, notamment l'applicabilité au domaine microbiologique des connaissances sur les transferts de milieu et leur modélisation, par exemple :

- le transport de sol par érosion pluviale au niveau d'une parcelle ou d'un bassin versant,
- la mise en suspension de particule de sol sous l'effet du vent à partir d'une source d'émission plane ou volumique,

Des études épidémiologiques pourraient également s'avérer profitables à proximité des zones d'épandage et des grandes plateformes de compostage ou de stockage des déchets. Cependant, étant donné les nombreux facteurs de confusion à prendre en compte (perception des odeurs, etc.), une étude de faisabilité préalable s'avère absolument nécessaire afin de définir les protocoles pertinents. A priori, une étude afin de définir les protocoles pertinents. A priori, une étude de type panel au niveau de la population riveraine d'une plateforme de traitement/compostage des déchets, permettrait d'étudier les associations entre des données d'émission de particules (modélisation, capteurs, etc.) et des indicateurs sanitaires, en tenant compte des nombreux facteurs de confusion.



## 2.13. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFSSA 2008. Une méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale.
- ALSHAHNI, M. M., MAKIMURA, K., YAMADA, T., SATOH, K., ISHIHARA, Y., TAKATORI, K. & SAWADA, T. 2009. Direct colony PCR of several medically important fungi using Ampdirect plus. *Jpn J Infect Dis*, 62, 164-7.
- ATWILL, E. R., HOU, L., KARLE, B. M., HARTER, T., TATE, K. W. & DAHLGREN, R. A. 2002. Transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts through vegetated buffer strips and estimated filtration efficiency. *Appl Environ Microbiol*, 68, 5517-27.
- BAERTSCH, C., PAEZ-RUBIO, T., VIAU, E. & PECCIA, J. 2007. Source tracking aerosols released from land-applied class B biosolids during high-wind events. *Appl Environ Microbiol*, 73, 4522-31.
- BARTRAND, T. A., WEIR, M. H. & HAAS, C. N. 2008. Dose-response models for inhalation of *Bacillus anthracis* spores: interspecies comparisons. *Risk Anal*, 28, 1115-24.
- BOUTRIF, E. 2002. Risques liés à la présence de substances indésirables dans l'alimentation animale et les produits animaux.
- BROOKS, J. P., TANNER, B. D., GERBA, C. P., HAAS, C. N. & PEPPER, I. L. 2005a. Estimation of bioaerosol risk of infection to residents adjacent to a land applied biosolids site using an empirically derived transport model. *J Appl Microbiol*, 98, 397-405.
- BROOKS, J. P., TANNER, B. D., JOSEPHSON, K. L., GERBA, C. P., HAAS, C. N. & PEPPER, I. L. 2005b. A national study on the residential impact of biological aerosols from the land application of biosolids. *J Appl Microbiol*, 99, 310-22.
- BURNETT, S. L., CHEN, J. & BEUCHAT, L. R. 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Appl Environ Microbiol*, 66, 4679-87.
- BURTSCHER, C. & WUERTZ, S. 2003. Evaluation of the use of PCR and reverse transcriptase PCR for detection of pathogenic bacteria in biosolids from anaerobic digestors and aerobic composters. *Appl Environ Microbiol*, 69, 4618-27.
- CAC 1999. Principes et directives régissant la conduite d'une évaluation de risque microbiologique.
- CARTWRIGHT, C., HORROCKS, S. K., J. & CROOK, B. 2009. Review of methods to measure bioaerosols from composting sites.
- CHINA, B., GHAFIR, Y. & DAUBE, G. 2002. Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Ann. Méd. Vét*, 147, 99-109.
- CSTB 2006. Synthèse bibliographique sur les méthodes de mesure des aérosols de Légionelles.
- DA SILVA, A. K., LE SAUX, J. C., PARNAUDEAU, S., POMMEPUY, M., ELIMELECH, M. & LE GUYADER, F. S. 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl Environ Microbiol*, 73, 7891-7.
- DEACON, L., PANKHURST, L., LIU, J., DREW, G. H., HAYES, E. T., JACKSON, S., LONGHURST, J., LONGHURST, P., POLLARD, S. & TYRREL, S. 2009. Endotoxin emissions from commercial composting activities. *Environ Health*, 8 Suppl 1, S9.
- DREW, G. H., DEACON, L. J., PANKHURST, L., POLLARD, S. J. T. A., TYRREL, S. F. & UNIVERSITY, C. 2009. *Guidance on the evaluation of bioaerosol risk assessments for composting facilities*, UK Environment Agency.
- DREW, G. H., LONGHURST, P. J., POLLARD, S. J. T., SMITH, R. A. & TYRREL, S. F. 2008. Development of Amenity Risk Assessments at Organic Waste Treatment Facilities.
- FANNIN, K. F., VANA, S. C. & JAKUBOWSKI, W. 1985. Effect of an activated sludge wastewater treatment plant on ambient air densities of aerosols containing bacteria and viruses. *Appl Environ Microbiol*, 49, 1191-6.
- FSIS 2001. Risk Assessment of the Public Health Impact of *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef.
- GALE, P. 2005. Land application of treated sewage sludge: quantifying pathogen risks from consumption of crops. *J Appl Microbiol*, 98, 380-96.
- GALE, P. & STANFIELD, G. 2001. Towards a quantitative risk assessment for BSE in sewage sludge. *J Appl Microbiol*, 91, 563-9.
- GERBA, C. P., CASTRO-DEL CAMPO, N., BROOKS, J. P. & PEPPER, I. L. 2008. Exposure and risk assessment of *Salmonella* in recycled residuals. *Water Sci Technol*, 57, 1061-5.
- GERBA, C. P. & SMITH, J. E., JR. 2005. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J Environ Qual*, 34, 42-8.

- GUO, X., CHEN, J., BRACKETT, R. E. & BEUCHAT, L. R. 2002. Survival of Salmonella on tomatoes stored at high relative humidity, in soil, and on tomatoes in contact with soil. *J Food Prot*, 65, 274-9.
- HERR, C. E., ZUR NIEDEN, A., JANKOFKY, M., STILIANAKIS, N. I., BOEDEKER, R. H. & EIKMANN, T. F. 2003. Effects of bioaerosol polluted outdoor air on airways of residents: a cross sectional study. *Occup Environ Med*, 60, 336-42.
- INERIS 2001. Le risque biologique et la méthode d'évaluation du risque. 111.
- INERIS 2007a. Endotoxines. Eléments disponibles pour une évaluation des risques sanitaires en lien avec les émissions des établissements classés pour l'environnement.
- INERIS 2007b. Bases scientifique de l'évaluation des risques sanitaires relatifs aux agents pathogènes.
- INGHAM, S. C., LOSINSKI, J. A., ANDREWS, M. P., BREUER, J. E., BREUER, J. R., WOOD, T. M. & WRIGHT, T. H. 2004. Escherichia coli contamination of vegetables grown in soils fertilized with noncomposted bovine manure: garden-scale studies. *Appl Environ Microbiol*, 70, 6420-7.
- INGLIS, G. D. & KALISCHUK, L. D. 2004. Direct quantification of Campylobacter jejuni and Campylobacter lanienae in feces of cattle by real-time quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol*, 70, 2296-306.
- IOM 2008. Exposure-response relationships for bioaerosol emissions from waste treatment processes.
- JEAN, J., BLAIS, B., DARVEAU, A. & FLISS, I. 2001. Detection of hepatitis A virus by the nucleic acid sequence-based amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*, 67, 5593-600.
- JIMENEZ, B. 2007. Helminth ova control in sludge: a review. *Water Sci Technol*, 56, 147-55.
- LAKE, R., HUDSON, A. & CRESSEY, P. 2002. Profile: Mycobacterium bovis in milk.
- LAZCKA, O., DEL CAMPO, F. J. & MUNOZ, F. X. 2007. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens Bioelectron*, 22, 1205-17.
- LENTERS, V., BASINAS, I., BEANE-FREEMAN, L., BOFFETTA, P., CHECKOWAY, H., COGGON, D., PORTENGEN, L., SIM, M., WOUTERS, I. M., HEEDERIK, D. & VERMEULEN, R. 2010. Endotoxin exposure and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis of the published literature on agriculture and cotton textile workers. *Cancer Causes Control*, 21, 523-55.
- LIGNELL, U., MEKLIN, T., RINTALA, H., HYVARINEN, A., VEPSALAINEN, A., PEKKANEN, J. & NEVALAINEN, A. 2008. Evaluation of quantitative PCR and culture methods for detection of house dust fungi and streptomycetes in relation to moisture damage of the house. *Lett Appl Microbiol*.
- MAP, MSA & INRS 2005. Salmonelloses. MAP (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche)  
MSA (Mutualité Social Agricole)  
INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité).
- MAP, MSA & INRS 2008. Listériose. MAP (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche)  
MSA (Mutualité Social Agricole)  
INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité).
- NANDAKUMAR, V., LA BELLE, J. T., REED, J., SHAH, M., COCHRAN, D., JOSHI, L. & ALFORD, T. L. 2008. A methodology for rapid detection of Salmonella typhimurium using label-free electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens Bioelectron*, 24, 1045-8.
- NAVARRO, I., JIMENEZ, B., LUCARIO, S. & CIFUENTES, E. 2009. Application of Helminth ova infection dose curve to estimate the risks associated with biosolid application on soil. *J Water Health*, 7, 31-44.
- NRC 2002. Biosolids applied to land: Advancing standards and practices.
- OMS 2004. Caractérisation des dangers liés à la présence de pathogènes dans les aliments et dans l'eau.
- OPPLIGER, A., CHARRIERE, N., DROZ, P. O. & RINSOZ, T. 2008. Exposure to bioaerosols in poultry houses at different stages of fattening; use of real-time PCR for airborne bacterial quantification. *Ann Occup Hyg*, 52, 405-12.
- PACHEPSKY, Y. A., SADEGHI, A. M., BRADFORD, S. A., SHELTON, D. R., GUBER, A. K. & DAO, T. 2006. Transport and fate of manure-borne pathogens: Modeling perspective. *Agricultural water Management*, 86, 81-92.
- PAEZ-RUBIO, T., RAMARUI, A., SOMMER, J., XIN, H., ANDERSON, J. & PECCIA, J. 2007. Emission rates and characterization of aerosols produced during the spreading of dewatered class B biosolids. *Environ Sci Technol*, 41, 3537-44.
- PEPPER, I. L., ZERZGHI, H., BROOKS, J. P. & GERBA, C. P. 2008. Sustainability of land application of class B biosolids. *J Environ Qual*, 37, S58-67.

- PLACENCIA, A. M., PEELER, J. T., OXBORROW, G. S. & DANIELSON, J. W. 1982. Comparison of bacterial recovery by Reuter centrifugal air sampler and slit-to-agar sampler. *Appl Environ Microbiol*, 44, 512-3.
- RYLANDER, R. 1999. Indoor air-related effects and airborne (1 → 3)-beta-D-glucan. *Environ Health Perspect*, 107 Suppl 3, 501-3.
- SAMADI, S., WOUTERS, I. M., HOUBEN, R., JAMSHIDIFARD, A. R., VAN EERDENBURG, F. & HEEDERIK, D. J. 2009. Exposure to inhalable dust, endotoxins, beta(1->3)-glucans, and airborne microorganisms in horse stables. *Ann Occup Hyg*, 53, 595-603.
- SEMENOV, A. V., VAN OVERBEEK, L. & VAN BRUGGEN, A. H. 2009. Percolation and survival of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica serovar Typhimurium in soil amended with contaminated dairy manure or slurry. *Appl Environ Microbiol*, 75, 3206-15.
- SOLOMON, E. B., YARON, S. & MATTHEWS, K. R. 2002. Transmission of Escherichia coli O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl Environ Microbiol*, 68, 397-400.
- SRIKANTH, P., SUDHARSANAM, S. & STEINBERG, R. 2008. Bio-aerosols in indoor environment: composition, health effects and analysis. *Indian J Med Microbiol*, 26, 302-12.
- STAGG, S., BOWRY, A., KELSEY, K. A., CROOK, B. & LABORATORY, H. A. S. 2010. *Bioaerosol emissions from waste composting and the potential for workers' exposure*.
- STETZENBACH, L. D., BUTTNER, M. P. & CRUZ, P. 2004. Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Curr Opin Biotechnol*, 15, 170-4.
- SWAN, J., KELSEY, A., CROOK, B. & GILBERT, E. 2003. Occupational and environmental exposure to bioaerosols from composts and potential health effects - A critical review of published data.
- TAHA, M. P. M., DREW, G. H., LONGHURST, P. J., SMITH, R. & POLLARD, S. J. T. 2006. Bioaerosol releases from compost facilities: evaluating passive and active source terms at a green waste facility for improved risk assessments.
- TANNER, B. D., BROOKS, J. P., GERBA, C. P., HAAS, C. N., JOSEPHSON, K. L. & PEPPER, I. L. 2008. Estimated occupational risk from bioaerosols generated during land application of class B biosolids. *J Environ Qual*, 37, 2311-21.
- TANNER, B. D., BROOKS, J. P., HAAS, C. N., GERBA, C. P. & PEPPER, I. L. 2005. Bioaerosol emission rate and plume characteristics during land application of liquid class B biosolids. *Environ Sci Technol*, 39, 1584-90.
- TORTORA, J., FUNKE, B. & CASE, C. 2003. *Introduction à la microbiologie*, Saint-Laurent Québec, ERPI.
- TURNER, S., HOPKINSON, J., OXLEY, L., GADD, S., HEALEY, N. & MARLOW, P. 2008. Collecting, transfer, treatment and processing household waste and recyclables.
- UK-EA 2004. *Monitoring of particulate matter in ambient air around waste facilities*, UK-Environmental Agency.
- UK-EA 2008. Bioaerosols in waste composting: deriving source terms and characterising profiles.
- UKUKU, D. O., C-H., L. & GEMBEH, S. 2005. Attachment of Bacterial Human Pathogens on Fruit and Vegetable Surfaces. *Produce Degradation: Pathways and Prevention*.
- US-EPA 2005. Detecting and Mitigating the Environmental Impact of Fecal Pathogens Originating from Confined Animal Feeding Operations: Review.
- US-EPA 2007. A Compendium of Prior and Current Microbial Risk Assessment Methods.
- US-EPA 2008. Problem Formulation for Human Health Risk Assessments of Pathogens in Land-applied Biosolids. US EPA.
- VANHEE, L. M., NELIS, H. J. & COENYE, T. 2009. Detection and quantification of viable airborne bacteria and fungi using solid-phase cytometry. *Nat Protoc*, 4, 224-31.
- WHO 2004. Risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods.
- WHO 2009a. Risk assessment of Campylobacter spp. in broiler chickens.
- WHO 2009b. Risk Characterization of Microbiological Hazards in Food.
- WISE, M. G. & SIRAGUSA, G. R. 2005. Quantitative detection of Clostridium perfringens in the broiler fowl gastrointestinal tract by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, 71, 3911-6.
- YAMAMOTO, N., KIMURA, M., MATSUKI, H. & YANAGISAWA, Y. 2010. Optimization of a real-time PCR assay to quantitate airborne fungi collected on a gelatin filter. *J Biosci Bioeng*, 109, 83-8.
- ZENG, Q. Y., WESTERMARK, S. O., RASMUSON-LESTANDER, A. & WANG, X. R. 2004. Detection and quantification of Wallemia sebi in aerosols by real-time PCR, conventional PCR, and cultivation. *Appl Environ Microbiol*, 70, 7295-302.
- ZOUROB, M., ELWARY, S. & TURNER, A. 2008. *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*.

### **3. DEUXIÈME PARTIE : CONSULTATION DES EXPERTS INSTITUTIONNELS**

Cette partie du travail a consisté à récolter auprès d'institutions françaises, des informations sur leurs prises en charge du risque biologique.

### **3.1. MÉTHODOLOGIE**

Les différentes institutions consultés sont les suivantes : l'Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles (INRS), l'Agence Française de Sécurité Sanitaires des Aliments (AFSSA) devenue depuis l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES) et l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS).

Des informations sur le risque biologique ont aussi été recueillies auprès de la Mutualité Sociale Agricole (MSA). Les données disponibles sur le risque biologique dans l'enquête Sumer sont aussi évoquées.

Les informations ont été recueillies par contact direct, à partir de publications ou sur les sites internet.

### **3.2. L'INRS**

Le risque biologique est une des thématiques de prévention de l'INRS faisant l'objet d'une approche « projet ». Cette approche se caractérise par un décloisonnement (de la recherche à la formation et à la valorisation des actions) et une pluridisciplinarité (intervention des différents départements de recherche).

Les informations mises à disposition sur le risque biologique au niveau du site internet de l'INRS sont nombreuses : dossiers sur la thématique, bases de données, brochures et résultats de travaux de recherche. Les différents contenus sont décrits en annexe 1.

Les travaux de recherche portent sur la métrologie des bioaérosols et sur les effets sanitaires associés, ils sont décrits ci-dessous. Outre les risques infectieux, les risques immunoallergiques, toxiques ou cancérigènes sont pris en compte dans les travaux. Les activités de recherche (métrologie, épidémiologie, étude des nuisances...), de formation, d'assistance et d'information contribuent à atteindre l'objectif du projet de l'INRS « Aide à l'évaluation du risque biologique en entreprise ».

#### **3.2.1. MÉTROLOGIE DES BIOAÉROSOLS**

La thématique " Métrologie des Bioaérosols " de l'INRS a pour objectif principal de développer des méthodes et des protocoles de mesure exportables à moyen terme vers d'autres laboratoires d'hygiène industrielle, notamment les laboratoires interrégionaux des CRAM. Dans ce but, une unité de microbiologie a été développée au sein du Laboratoire de Métrologie des Aérosols (LMA - Département Métrologie des Polluants) entre 2003 et 2006. Certains des travaux sur la métrologie des bioaérosols ont par ailleurs été menés avec d'autres organismes ou laboratoires nationaux (par exemple le Centre Scientifique et Technique du Bâtiment) ou internationaux (comme l'Institut de Santé au Travail à Lausanne).

Des travaux ont été menés sur l'échantillonnage et l'analyse des bioaérosols (Duquenne et Greff-Mirguet, 2005 ; Gorner et al. 2006a, 2006b).

D'autres travaux ont spécifiquement porté sur la détermination des endotoxines dans l'air avec des mesurages dans l'air des égouts (Duquenne et al. 2004). Une étude bibliographique a aussi été publiée en 2002 sur leur échantillonnage et leur analyse (Greff-Mirguet, 2002). Enfin, une fiche Métropol (fiche technique décrivant les méthodes de prélèvement et d'analyse des polluants présents dans l'air des locaux de travail) a été établie en 2010 (fiche Métropol 089/V02.01, 2010).

### 3.2.2. TRAVAUX SUR LES RISQUES BIOLOGIQUES

Deux études de l'INRS sont actuellement en cours sur les risques biologiques sont liées aux activités de compostage :

1 - « Risques chimiques et biologiques liés aux activités de compostage ». Etude démarrée en 2006 Cette étude (référéncée B.5/1.045) a pour but :

- de parfaire les connaissances en matière de risques chimiques et biologiques dans les centres de compostages,
- de définir une stratégie métrologique permettant de réaliser des mesures d'exposition qui permettront d'envisager des opérations ultérieures en matière de prévention collective.

Des résultats issus de cette étude ont été publiés fin 2010 (Poirot et al. 2010). Trois types d'agents biologiques ont été mesurés : endotoxines, bactéries et moisissures cultivables. Des prélèvements répétés d'ambiance ont été réalisés sur 2 jours dans 10 entreprises (plateformes de compostage couvertes). D'une manière générale, les niveaux de bioaérosols mesurés varient beaucoup d'une plateforme à l'autre et d'un point de prélèvement à l'autre (réception des déchets, broyage, hall de fermentation etc.) sur une même plateforme. Par ailleurs, les niveaux d'endotoxines sont significativement plus élevés en été. 56 % des concentrations d'endotoxines sont supérieures à 50 EU/m<sup>3</sup>, et la concentration maximale détectée est de 27 561 EU/m<sup>3</sup>. Ces résultats sont en accord avec ce qui est décrit dans la littérature (cf chapitre 2.7.4.4). De même, les concentrations de microorganismes sont en accord avec celles déjà décrites.

2 - « Inflammation des voies aériennes et exposition microbiologique des travailleurs des plates-formes de compostage : une étude longitudinale » (référéncée B.5/2.057), étude démarrée en 2008 (en collaboration avec l'ADEME et la FNADE) à la suite d'une étude pilote menée en 2007 (« Risques sanitaires parmi les salariés des plates-formes de compostage : une étude pilote » référéncée B.5/2.055)

L'objectif de l'étude pilote était d'établir une typologie des plates-formes en France et de se prononcer sur la faisabilité d'une étude épidémiologique longitudinale des risques sanitaires dans ce milieu.

La méthode a consisté en l'envoi aux exploitants d'un questionnaire postal sur l'activité de 2006, des visites sur le terrain et des mesures d'exposition. Environ 700 plates-formes ont été recensées.

L'analyse des données a montré que la médiane du tonnage traité est de 7000 tonnes/an et l'effectif médian est de 2 opérateurs par plate-forme. Une typologie a été établie, elle comprend 13 types de plates-formes, sur la combinaison de leurs caractéristiques techniques, représentant 70 % des plates-formes et 61 % des opérateurs. Le type le plus fréquent est une plate-forme à l'air libre (57 %), traitant des déchets verts (73 %), à l'aide de retournements (64 %). Un changement technique dans les 2 ans est prévu par 13 % des plates-formes. Les caractéristiques des opérateurs sont en faveur de la stabilité de ces professionnels. Les visites sur le terrain ont permis de mettre au point les techniques de mesure et d'identifier les postes de travail.

L'étude longitudinale est une étude prospective sur 2 ans avec des examens médicaux tous les 6 mois. Elle cherche à mettre en évidence une association entre :

- exposition aux agents microbiologiques : Actinomycètes et *Aspergillus Fumigatus* et aux endotoxines,
- et symptômes ou signes d'inflammation (mesure du NO exhalé, test de provocation non spécifique à la métacholine) des voies aériennes, par comparaison avec des travailleurs non exposés.

Le choix des 3 indicateurs actinomycètes, *aspergillus fumigatus* et endotoxines a été basé sur le raisonnement suivant (Colette Lebacle, communication personnelle). « Le compostage est le résultat d'un activité microbiologique intense et multiple. Actinomycètes et *Aspergillus fumigatus* sont largement répandus et font partie de notre environnement habituel. Ils participent largement à l'activité de compostage. Les endotoxines sont produites lors de la multiplication des bactéries Gram négatif et lors de leur lyse en fin de vie. Face à la diversité biologique qui existe dans un andain, ces 3 indicateurs ont été retenus sur la fréquence de leur présence, la notion qu'ils étaient présents en large quantité et donc plus facile à identifier et quantifier. Par ailleurs, ces 3 indicateurs ont des effets sur la santé bien documentés, en particulier pour ce qui est de l'atteinte broncho-pulmonaire, ce qui est loin d'être le cas pour les autres micro-organismes présents. Enfin, le centre de recherche de l'INRS a l'expérience de leur métrologie (collecte des bioaérosols et mise en culture).

Une matrice emploi-exposition par type de plate-forme sera construite. L'étude épidémiologique en rapprochera les données des tests pulmonaires à l'exposition chiffrée des agents. Cette étude se déroule sur 2 ans de façon à couvrir les variations de l'intensité des expositions en fonction des variations climatiques. La quantification de l'association exposition - effets sur la santé devra permettre de justifier et de cibler la prévention. La publication des résultats n'est pas attendue avant fin 2012. »

### 3.3. L'ANSES (AFSSA)

Les risques biologiques abordés par l'AFSSA sont limités au contexte de l'hygiène des aliments et des eaux de consommations.

#### Hygiène des aliments

Le laboratoire d'études et de recherche sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires ainsi que l'unité d'évaluation des risques biologiques de la Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires travaillent sur cette thématique (qui commence au début de la chaîne de l'alimentation avec les règles d'hygiène pour les professionnels, et va jusqu'aux conseils d'hygiène domestique).

#### Eaux et risques microbiologiques

Les agents microbiologiques (bactéries, virus ou parasites), présents dans les eaux, peuvent être à l'origine de maladies infectieuses, essentiellement des gastro-entérites. Ils constituent le principal risque à court terme pour la santé lié à une contamination de l'eau.

En France, l'investigation des épidémies de gastro-entérites d'origine hydrique entre 1998 et 2006 (Détection et investigation des épidémies d'infection liées à l'ingestion d'eau de distribution (2007), sur le site de l'InVS) situe les points d'entrée de la pollution à part égale entre la ressource et le réseau de distribution. Les agents pathogènes identifiés sont représentés par des bactéries du genre *Campylobacter*, des parasites du genre *Cryptosporidium* et des virus majoritairement des norovirus.

L'Afssa évalue les risques liés à la présence de micro-organismes dans les eaux. Ses actions dans ce domaine sont multiples :

- Dans le cadre de la thématique « virus transmissibles à l'homme par voie orale », un groupe de travail dédié a mené une réflexion sur l'estimation du risque infectieux lié à la présence de virus dans l'eau et les aliments. Compte tenu de la difficulté de caractériser de façon sûre le risque infectieux lié à la présence de virus dans l'eau avec les méthodes de biologie moléculaire, l'Afssa a développé un logigramme d'interprétation des données d'analyse qui constitue un outil d'aide à la décision pour les gestionnaires du risque. L'Agence a également réalisé une étude prédictive pour quantifier les risques liés à la présence de norovirus, un agent responsable de gastro-entérites virales, dans les eaux de distribution en fonction de différents niveaux de contamination. En 2005, alors que des cas de grippe aviaire de souche asiatique ont été détectés en Europe, l'Afssa a été saisie afin d'estimer le risque de contamination de l'homme par l'eau de consommation. Cette analyse a permis de mettre en évidence qu'un tel risque en France était nul ou négligeable, compte tenu des souches circulantes.
- En 2006, l'Agence a réalisé, en collaboration avec l'Afssset, un état actualisé des connaissances relatives aux cyanobactéries en France et compte tenu des données actuelles, a esquissé des tendances concernant les risques liés à la présence de microcystine LR dans les eaux destinées à la consommation humaine.
- -En septembre 2003, l'Afssa a évalué le risque lié à la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques (humains ou vétérinaires) dans les eaux. Cette saisine, conjointe avec l'Afssset, avait pour but d'identifier l'origine de ces micro-organismes et d'évaluer le risque lié à leur présence pour la santé humaine et notamment pour les populations dont les défenses immunitaires sont altérées. Ces travaux ont fait l'objet d'un rapport publié en février 2007.

- Dans le domaine de la parasitologie, une évaluation quantitative du risque sanitaire lié aux infections à *Cryptosporidium parvum* dans l'eau de distribution publique a été menée et constitue encore actuellement une base de travail. L'Afssa a collaboré récemment à une étude relative à l'analyse quantitative du risque lié à la contamination des ressources en eau par *Cryptosporidium* appliquée au niveau local.

### 3.4. L'INVS

Pour rappel, les missions de l'INVS sont les suivantes

- la surveillance et l'observation permanentes de l'état de santé de la population,
- la veille et la vigilance sanitaires,
- l'alerte sanitaire,
- une contribution à la gestion des situations de crise sanitaire.

Les missions de l'InVS s'appliquent à l'ensemble des domaines de la santé publique :

- les maladies infectieuses : infection par le VIH, virus des hépatites B et C, infections sexuellement transmissibles, tuberculose, risques infectieux d'origine alimentaire, zoonoses, maladies évitables par la vaccination, infections nosocomiales et résistance aux antibiotiques, infections respiratoires, grippe saisonnière et grippe pandémique, arboviroses, maladies tropicales et risques d'importation ;
- les effets de l'environnement sur la santé : risques liés à la pollution de l'air, aux expositions aux polluants chimiques, aux rayonnements ionisants, risques hydriques, nuisances physiques, risques liés aux variations climatiques... ;
- les risques d'origine professionnelle : cancers d'origine professionnelle, effets de l'amiante et des fibres de substitution, troubles musculo-squelettiques, morbidité liée aux expositions professionnelles... ;
- les maladies chroniques et les traumatismes : cancers, maladies cardio-vasculaires, diabète, nutrition, accidents et traumatismes, maladies respiratoires, santé mentale, maladies rares... ;
- les risques internationaux et tropicaux : maladies infectieuses touchant d'autres pays mais susceptibles d'atteindre des ressortissants français ou d'être importées (grippe pandémique, Ebola, fièvre jaune, arboviroses), maladies et menaces touchant les départements d'outre mer et les départements français d'Amérique : dengue, maladie de Chagas, pollution par les pesticides ou le mercure...

Il n'y a pas de travaux particuliers sur la prise en charge du risque microbiologique par rapport aux déchets menés à l'InVS (Frédéric Dor, Pascal EMPEREUR-BISSONNET, Isabelle CAPEK, communication personnelle).

- Dans l'unité maladies entériques, alimentaires et zoonoses qui concerne la surveillance des cas humains en population générale de ces maladies et éventuellement l'investigation de cas groupés, il a pu arriver que certaines épidémies aient été reliées à des problèmes de déchets (par exemple station d'épuration incriminée dans la contamination de coquillages à l'origine d'hépatite A, eau de distribution polluée à l'origine de toxi-infection alimentaire collective (TIAC), épandages à l'origine de cas de fièvre Q, ...). Cependant ces éléments épars ne sont pas regroupés sous l'étiquette risques microbiologiques liés à des déchets et, il n'y a pas de réflexion particulière sur le risque microbiologique autour des déchets à l'InVS ni de travail « théorique » mené sur ce thème.
- Des travaux concernant l'eau ont été menés soit à travers les gastroentérites ou les légionnelles. Un travail particulier sur *Ostreopsis Ovata* a été réalisé concernant les baignades ou jeux dans l'eau de mer (F. Kermarec et al. 2008).



### 3.5. LA MSA

Les professions agricoles étant particulièrement exposées au risque biologique, la MSA a été contacté afin d'obtenir des informations sur la manière dont elle prenait en charge ce risque.

A la MSA, la thématique risque biologique est quasi exclusivement axée sur les zoonoses. La MSA a impulsé la création d'un réseau multi partenarial de surveillance et de prévention des zoonoses, en collaboration avec l'Institut de veille sanitaire. Ce réseau inclut des experts et spécialistes (écoles vétérinaires, unités de recherche, directions régionales et départementales vétérinaires etc.), des intervenants de terrains (médecins, techniciens de prévention etc.) et des usagers (fédérations professionnelles, associations etc.).

Par ailleurs, des études ponctuelles ont été menées par la MSA notamment en collaboration avec des équipes extérieures sur le risque biologique non zoonotique. D'une manière générale, ces travaux de nature épidémiologique ont été menés sur les pathologies respiratoires en milieu agricole (poumons du fermier, pneumopathie d'hypersensibilité, bronchite chronique, asthme et allergie, syndrome toxique des poussières organiques etc.).

Deux études sont actuellement en cours :

- L'étude FERMA en Auvergne : étude sur les pathologies respiratoires en milieu agricole (collaboration du P Caillaud, pneumologue du CHU Clermont Ferrant et A Amnesi Maesano, INSERM, Paris),
- L'étude Airpoul en Bretagne sur les éleveurs en milieux avicoles (collaboration AFSSA, Chu Brest, SEPIA-santé). Le projet Airpoul propose de mesurer la relation dose réponse entre maladies respiratoires et concentrations en poussières (< 4 µm ; mesurées à l'aide de capteurs personnels).

Aucune étude liée à l'épandage des boues par des agriculteurs n'a été identifiée.

### 3.6. L'ENQUETE SUMER (DARES/DGT)

L'enquête SUMER (Surveillance médicale des risques) est copilotée par la Dares (Direction de l'animation de la recherche, des études et des statistiques, direction dépendant conjointement du ministère de l'économie, de l'industrie et de l'emploi et du ministère du travail, de la solidarité et de la fonction publique et de la DGT (Inspection médicale du travail).

Elle a permis d'évaluer le nombre de salariés potentiellement exposés à des risques biologiques et de décrire les contraintes organisationnelles, les expositions professionnelles de type physique, biologique et chimique auxquelles sont soumis les salariés.

Ses objectifs sont de :

- offrir aux préventeurs un état des lieux des expositions professionnelles aux nuisances ou aux situations de travail susceptibles d'être néfastes pour la santé, étape nécessaire à la mise en place de mesures de prévention au niveau local, régional et national (veille sanitaire). Cet état des lieux peut se faire en fonction du secteur d'activité, de la taille de l'établissement employeur et des caractéristiques personnelles et socioprofessionnelles du salarié.
- offrir au législateur la possibilité de confronter le champ de la réglementation en hygiène et sécurité à la réalité des expositions professionnelles.
- offrir aux chercheurs une référence pour établir des priorités d'études, fondamentales ou appliquées.
- 

Des données ont été recueillies en 1994 et en 2002-2003 par les médecins du travail lors de l'entretien médico-professionnel au cours des visites périodiques.

En 1994, l'enquête couvrait l'ensemble des salariés surveillés par la médecine du travail du régime général et de la Mutualité Sociale Agricole. En 2003, le champ a pu être étendu aux hôpitaux publics, à EDF-GDF, La Poste, la SNCF et Air France. Les résultats ne couvrent cependant pas les fonctions publiques d'Etat et territoriale, une partie des transports (régies urbaines, et transport par eau), les

mines, la pêche, France Télécom... Suite à l'extension de son champ, Sumer 2003 est représentative de 17,5 millions de salariés soit 80% de l'ensemble des salariés. Toutefois, certains secteurs sont incomplets, par exemple ceux des transports, de l'éducation, des Administrations.

A l'exception des contraintes organisationnelles qui font référence à la situation habituelle de travail, le questionnement sur les autres expositions (physiques, biologiques et chimiques) porte sur la dernière semaine travaillée afin de cerner au plus près la réalité concrète du travail des salariés enquêtés. Cette méthode peut avoir comme effet de sous-évaluer les expositions liées à des activités ponctuelles ou irrégulières, qui ont moins de chances d'avoir eu lieu au cours de cette période que les activités régulières.

Il ressort que **15 % des salariés (2,6 millions de personnes) exercent des activités professionnelles pouvant les exposer à des agents biologiques** (Guignon et Sandret, 2003) :

- 54 % sont exposés du fait de contact avec des agents biologiques d'origine humaine
- 8 % parce qu'ils sont en contact avec des animaux
- 23 % (environ 600 000 personnes) parce qu'ils exercent des activités dans les domaines de l'assainissement, des déchets ou de la production alimentaire

### 3.7. RÉFÉRENCES

#### **INRS**

Duquenne P., Ambroise D., Gorner P., Greff-Mirguet G., Fabries J.F. Mesurage des endotoxines dans l'air au cours du travail dans les égouts. *In : Actes du 20e Congrès Français sur les Aérosols, CFA 2004, Paris, 8-9 décembre 2004, pp. 92-99.*

Duquenne P., Greff-Mirguet G. L'échantillonnage et l'analyse des aérosols microbiens. Hygiène et sécurité du travail - Cahiers de notes documentaires, 2005, n° 198, ND 2222, pp. 23-28.

Gorner P., Fabries J.F., Duquenne P., Witschger O., Wrobel R. Bioaerosol sampling by a personal rotating cup sampler CIP 10-M. *Journal of Environmental Monitoring*, 2006a, vol. 8, n° 1, pp. 43-48.

Gorner P., Fabries J.F., Duquenne P., Witschger O., Wrobel R., Greff-Mirguet G. Echantillonner des bioaérosols sur les lieux de travail. *Salles propres*, 2006, n° 42, pp. 36-41.

Greff-Mirguet G. Echantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air. Etude bibliographique. Cahiers de notes documentaires. Hygiène et sécurité au travail. N°187, 2° trimestre 2002, p73-87.  
[http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/intranetobject-accesparreference/ND%202170/\\$file/nd2170.pdf](http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/intranetobject-accesparreference/ND%202170/$file/nd2170.pdf)

Metropol Endotoxine. Fiche 089/V02.01, 31/05/2010. [http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/inrs01\\_metropol\\_view/2D771F4B09B91B69C1256FFC0045EF63/\\$File/089.pdf](http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/inrs01_metropol_view/2D771F4B09B91B69C1256FFC0045EF63/$File/089.pdf).

Poirot P., Grosjean J., Monta N., Nicot T., Zimmermann F. Approche des risques chimiques et microbiologiques dans le secteur du compostage, 2010, ND 2336-221-10, pp3-15.

#### **INVS**

Kermarec F., Dor F., Armengaud A. et al. Les risques sanitaires liés à la présence d'*Ostreopsis ovata* dans les eaux de baignade ou d'activités nautiques. *Environnement, Risques & Santé*. Volume 7, Numéro 5, 357-63, septembre-octobre 2008.

#### **SUMER**

Guignon N., Sandret N., Les expositions aux agents biologiques dans le milieu de travail en 2003, *Premières Synthèses*, n° 26-1 juin 2003, Dares.

### 3.8. ANNEXE 1 : DESCRIPTION DES DOSSIERS, BASES DE DONNÉES ET BROCHURES CONCERNANT LE RISQUE BIOLOGIQUE SUR LE SITE INTERNET DE L'INRS

#### A. Dossier

Le dossier sur le « Risque biologique en milieu professionnel » comprend différentes rubriques dont les intitulés sont les suivants :

- Ce qu'il faut retenir
- Quelques chiffres
- Définitions et concepts généraux
- Répercussions sur la santé
- Démarche concrète de prévention
  - Evaluation des risques
  - Suppression / réduction des risques
  - Information et sensibilisation du personnel
  - Rôle spécifique des certains acteurs
  - Intégration dans une démarche globale de prévention
- Exemple de prévention des risques biologiques
- Métrologie
- Grossesse et risques biologiques
- Contexte réglementaire
- Réparation
- Pour en savoir plus en quelques clics...
- Autres références bibliographiques

Plusieurs dossiers sur la thématique déchet qui inclut l'ensemble des risques (biologique, chimique, cancérigène etc.) dans la rubrique « Déchets et risques professionnels » sont aussi disponibles :

- Caractérisation du secteur (effectifs de salariés, accidents du travail)
- Disposition réglementaires spécifiques aux déchets etc.
- Démarche concrète de prévention :
  - Evaluation des risques,
  - Combattre les risques à la source.

#### B. Bases de données

EFICATT : Exposition fortuite à un agent Infectieux et conduite à tenir en milieu du travail.

Il s'agit d'un guide constitué de fiches rédigées par un groupe de travail à l'initiative du département Etudes et assistance médicales de l'INRS, en collaboration avec le GERES (Groupe d'étude sur le risque d'exposition des soignants aux agents infectieux).

Ce guide, destiné en particulier aux médecins du travail, a pour but de leur apporter une aide lorsqu'ils sont confrontés à des salariés ayant subi une exposition accidentelle à un agent biologique pathogène (virus, bactéries, ...). Le guide EFICATT met à disposition du médecin les éléments utiles pour l'aider à évaluer le risque, définir la conduite à tenir immédiate, définir les actions à entreprendre ainsi que le suivi médical à mettre en place. L'accès se fait par maladie et par agent. Les agents concernés sont les suivants :

- - *Bacillus anthracis*
- - *Bordetella pertussis*
- - *Borrelia*
- - *Brucella*
- - *Chlamydomydia psittaci*
- - *Corynebacterium diphtheriae*
- - *Cytomegalovirus*
- - *Erysipelothrix rhusiopathiae*
- - *Herpès virus B*
- - *Legionella spp*
- - *Leptospira interrogans*
- - *Morbillivirus*
- - *Mycobacterium tuberculosis*
- - *Neisseria meningitidis*

- - Pasteurella spp
- - Plasmodium spp
- - Rotavirus
- - Rubivirus
- - Salmonella typhi
- - Sarcoptes Scabiei, variante hominis
- - Streptococcus pyogenes
- - Varicellovirus
- - VIH
- - Virus de la grippe
- - Virus de la rage
- - Virus de l'hépatite A
- - Virus de l'hépatite B
- - Virus de l'hépatite C
- - Virus des oreillons
- - Virus Puumala
- - Virus respiratoire syncytial
- - Virus Varicelle Zona

BAOBAB : BAse d'OBservation des Agents Biologiques.

Cette base de données est une aide à l'évaluation des risques biologiques. Elle contient des fiches synthétiques destinées à un large public.

La base reprend tous les agents biologiques infectieux classés par la réglementation, en apportant pour chacun des informations réglementaires et épidémiologiques. A l'aide du moteur de recherche, il est possible de connaître le groupe de risque auquel appartient un agent biologique, de trouver les réservoirs de cet agent (espèce animale, eau, sol...), les voies de transmission etc. Les données fournies sont les suivantes : description, réglementation, épidémiologie (voie de transmission, sources etc.).

**C. Brochure** : Mycotoxines en milieu de travail. II. Exposition, risques, prévention (Dossier médico-technique), 2010.

Les mycotoxines (aflatoxines, ochratoxine A, trichothécènes...) sont des substances toxiques sécrétées par des moisissures dans certaines conditions environnementales. Une exposition professionnelle a été rapportée dans les filières céréales, agroalimentaire (café, épices...), élevage, fabrication d'aliments pour animaux, compostage, certaines activités de laboratoire... Les mycotoxines peuvent être retrouvées sur des matériaux de construction et dans l'air intérieur de certains bâtiments humides. Les risques d'une exposition par voies respiratoire et cutanée ont été documentés par des études in vitro et in vivo chez l'animal. Peu de certitudes existent concernant les risques professionnels liés aux mycotoxines, mais certaines données incitent à prendre des mesures de prévention dès maintenant.