

Microorganismes pathogènes dans les filières de traitement des déchets

Cas des légionelles



C4H5O2_5 2/ 9/99 THERMC 4H 50 2 0G 300.000 5000.000/ 1392.000 1
1.64121890E+01 1.20184883E-02-4.40468566E-06 7.30124728E-10-4.42784365E-14 2

**MICROORGANISMES PATHOGENES DANS LES FILIERES
DE TRAITEMENT DES DECHETS :**

CAS DES LEGIONELLES

RAPPORT FINAL

juillet 2007

T. CHESNOT, A.-M. CHARISSOU, M.-J. JOURDAIN
- IPL santé environnement durables Est



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, Microorganismes pathogènes dans les filières de traitement des déchets : cas des légionelles, 2007, 75 p, n°05-0664/1A.
- ✓ Ces travaux ont reçu le soutien de l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie)
www.ademe.fr

© RECORD, 2007

RESUME

La légionellose est un problème de santé publique. Les principales sources de légionelles sont connues : il s'agit des réseaux d'eau chaude sanitaire, des tours aérorefrigérantes et des eaux minérales naturelles dans les établissements thermaux. Cependant, en dehors de ces matrices classiquement répertoriées, d'autres voies d'exposition sont maintenant suspectées. En effet les légionelles, bactéries ubiquitaires, pourraient trouver des conditions favorables à leur survie et peut-être à leur multiplication, dans des matrices jusqu'à présent ignorées. Dans la mesure où les déchets constituent des matrices organiques propices à une importante colonisation bactérienne, la possibilité d'un développement de populations de *Legionella spp* peut être suspectée. De plus les filières de traitement des déchets entraînent classiquement de nombreux aérosols, aussi la question de l'exposition des personnels et des populations riveraines des centres de déchets se pose légitimement.

Le présent rapport aborde la problématique de la présence des *Legionella* dans les filières déchets. Dans une première étape sont présentées les principales caractéristiques physiologiques et écologiques des légionelles. Ces données sont complétées par les informations relatives à l'épisode de cas groupés de légionellose de Harnes (manifestement imputable à un site industriel). Les éléments marquants de cette épidémie ont été mis en avant. Une étude des différentes filières déchets est ensuite exposée, elle a pour but d'identifier les filières et les déchets les plus à risque. Le danger qu'une filière puisse constituer un vecteur d'infection à *Legionella* (légionellose ou fièvre de Pontiac) est discuté suivant la probabilité de rencontrer simultanément au sein de cette filière les conditions favorables à la constitution d'un réservoir et à la production de bioaérosols infectieux à partir de ce réservoir. L'objet de ces réflexions a été à l'origine d'une étude de cas réalisée en début d'année 2007 dans un centre de compostage. Les hypothèses que les boues urbaines entrantes pouvaient abriter des *Legionella* et que des *Legionella* pouvaient également être mise en évidence au terme du processus de compostage ont été vérifiées.

L'étude met en évidence la possibilité que certains déchets, comme des boues de stations d'épuration, renferment des *Legionella* avant l'arrivée dans les filières de traitement. Elle met également en évidence qu'en dehors des phases de réception, de transfert ou de pré-traitement des déchets initialement contaminés, les filières de traitement « non biologiques » ne présentent pas d'étapes favorables au maintien d'un réservoir de *Legionella* sur le site. Concernant les traitements incluant des voies biologiques, c'est à dire les plates-formes de compostage et la majorité des stations d'épuration, il semble que les *Legionella* puissent être retrouvées dans des étapes plus en aval des filières. Ainsi, la présence de légionelles dans des bassins à boues activées, dans des lagunes, dans des effluents de stations d'épuration montre la possibilité pour la bactérie de s'installer au moins transitoirement à différents stades de traitement. De même, la présence de *Legionella* dans des composts en phase de maturation laisse également supposer que la bactérie pourrait persister dans certains procédés de compostage. L'existence de réservoirs de *Legionella* parmi les installations de traitement des déchets doit donc être envisagée notamment s'il s'agit de filière accueillant des boues de stations d'épuration. Pour autant les niveaux de contamination et la proportion de sites concernés restent à évaluer. Si la présence au moins ponctuelle de *Legionella* dans des bioaérosols issus de STEP ou de lagunes semble avérée, faute de données cette information n'est pas accessible pour les autres filières de déchets.

Mots clé : *Legionella*, légionellose, bioaérosols, déchets, stations d'épuration, centres de compostage.

SUMMARY

Legionellosis is a public health problem. The main roots of legionellosis are known : warm water supply network (showerheads, spas), cooling towers, mineral waters used by hydroopathic establishments. *Legionella* are ubiquitous and other matrices could provide convenient conditions for survival or growing of this bacteria. So gradually others ways for exposure are suspected. The waste contains many organic matter and are easily colonized by the bacteria, moreover waste processing involves many aerosols. Might waste involve a *Legionella* risk ? About microbiological hazards related to the waste treatment, legionellosis seems to be a legitimate subject to study.

This report deal with *Legionella* risk related to occurrence or growing of this bacteria through waste processing. The *Legionella* characteristics were exposed and bibliographic data were supplemented from informations related to legionellosis outbreak occurred in the city of Harnes (in France) : central informations concerning this outbreak (ascribable to an industrial site) were given. The main processes used by the waste treatment plants were described. The capability to cause *Legionella* infections was discussed from the probability of the process to combine, both *Legionella* reservoir and spreading of infectious aerosols starting from this reservoir. Finally, analysis of the bibliographic data involved a case study realized in a composting center. The assumption upon which the input sludges might contain *Legionella* and the hypothesis upon which *Legionella* might persist at the end of the composting process were investigated.

This study showed that *Legionella* was present in some wastes like sewage sludges delivered in treatment plants. About treatment processes without biological steps, only discharge step, transfer step or pre-treatment operations realized on initially contaminated waste might present a *Legionella* risk : these processes are not favorable for occurrence of *Legionella* reservoirs through waste treatment. About processes including biological steps, like composting centers and majority of the wastewater treatment plants, it seems that *Legionella* could be present through processing. So, *Legionella* occurrence in aerated tanks, in lagoons or in effluents of the wastewater treatment plants show that *Legionella* can be present transitorily during processing. In the same way, the detection of *Legionella* in compost during latter maturing period, suggests that *Legionella* could persist at the end of this biological treatment.

Legionella reservoirs might exist in the waste of the treatment centers especially when sewage sludges are processed but the level of contamination and part of the concerned plants should be evaluated. If occasional presence of *Legionella* in the wastewater treatment plants or in the lagoons is proved, because of the lack of data, this information is not available for the others waste treatment processes.

KEY WORDS : *Legionella*, legionellosis, bioaerosols, wastes, wastewater treatment plants, composting centers.

Sommaire

A.	CONTEXTE GENERAL ET OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	11
B.	OBJECTIFS DU RAPPORT.....	12
C.	RECHERCHE DES DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	13
D.	LEGIONELLA ET LEGIONELLOSE.....	15
I)	Historique.....	15
II)	Ecologie et pouvoir pathogène.....	15
II-1)	Ecologie des <i>Legionella</i>	15
II-1-1)	<i>Legionella</i> , une bactérie strictement aquatique ou une bactérie hydro-tellurique ?.....	15
II-1-2)	Oxygène dissous dans le milieu.....	16
II-1-3)	Conditions de salinité du milieu.....	16
II-1-4)	Conditions de pH.....	17
II-1-5)	Conditions de température.....	17
II-1-6)	Accès aux nutriments : les <i>Legionella</i> sous la dépendance de la flore associée.	17
□	Conditions ambiantes favorables :	17
□	Activités métaboliques.....	17
II-2)	Taxonomie et pouvoir pathogène.....	21
II-2-1)	Eléments de taxonomie, critères d'identification (Jarraud et Freney, 2006).	21
II-2-2)	Pouvoir pathogène	23
□	Influence de l'isolat bactérien.	23
□	Dose infectieuse.....	23
II-2-3)	Tableau clinique.....	24
III)	Mode de contamination.....	26
III-1)	Conditions d'aérosolisation.....	26
III-1-1)	Taille des aérosols.....	26
III-1-2)	Etat physiologique du micro-organisme avant aérosolisation	26
III-1-3)	Nature de la suspension à partir de laquelle sont générés les aérosols.....	27
III-2)	Conditions physico-chimiques ambiantes après aérosolisation.....	27
IV)	Profils des installations à risques	28
V)	Points a retenir	30
E.	LE DENOMBREMENT DES LEGIONELLA.....	31
I)	Méthode par culture sur milieu gélosé.....	31
Principe général :	31
Niveau d'information :	32
II)	PCR (Polymerase Chain Reaction) :	32
Principe général :	32
Niveau d'information :	32

III) FISH (fluorescent in situ hybridization) :	33
Principe général :	33
Niveau d'information :	33
IV) Conclusion	33
F. ANALYSE D'UN EXEMPLE DE CONTAMINATION DE SITE INDUSTRIEL.	
(BRETIN ET AL., 2004 ; BEH, 2004 ; NGUYEN ET AL., 2006)	33
I) LES DONNEES TERRAINS CONFRONTEES AUX DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.	34
I-1) Pathogénécité des espèces de <i>Legionella spp.</i>	34
I-2) Profil des malades : Adéquation avec les facteurs de risque répertoriés.	34
I-3) Diversités des équipements susceptibles d'héberger un réservoir de <i>Legionella</i> ?	34
I-4) Transfert de contamination depuis un foyer initial vers des foyers secondaires !	35
I-5) Survie et persistance de l'infectiosité des <i>Legionella</i> dans des bioaérosols ?	36
I-6) Methodologies de dénombrement de <i>Legionella</i> cultivables ou de génome de <i>Legionella</i> à partir d'aérosols.	37
II) Conclusions sur l'origine de la contamination	37
III) Points a retenir	38
G. DECHETS ET LEGIONELLES	39
I) Probabilites de présence et de prolifération des <i>Legionella</i> en fonction de la nature des déchets	39
I-1) Les déchets menagers et assimilés	39
I-2) Les déchets hospitaliers	40
I-2-1) Contenu.	40
I-2-2) Conditions de traitement.	40
<input type="checkbox"/> Cas des déchets non décontaminés	40
<input type="checkbox"/> Cas des déchets décontaminés	40
I-2-3) Relations avec les <i>Legionella</i> .	41
I-3) Le bois non traité et les matières organiques naturelles	42
I-4) Les boues	42
I-4-1) Contenu.	42
I-4-2) Conditions de traitement.	43
<input type="checkbox"/> Cas de l'épandage	43
<input type="checkbox"/> Cas des autres filières de traitement	43
I-4-3) Relations avec les légionelles.	43
I-5) Conclusion	44
II) Probabilités de présence et de prolifération des <i>Legionella</i> en fonction des filières de traitement des déchets.	44
II-1) L'INCINERATION	45
II-1-1) Description succincte :	45
II-2-1) Analyse de l'installation :	45
<input type="checkbox"/> Probabilités de constitution d'un réservoir.	46
<input type="checkbox"/> Probabilités d'émission d'aérosols.	46
II-2) LA CO-INCINERATION ET LES PROCEDES THERMIQUES	46
II-2-1) Description succincte de la co-incinération :	46
II-2-2) Description succincte des procédés thermiques :	47
II-2-3) Analyse des installations de co-incinération et de traitement thermique.	47
<input type="checkbox"/> Probabilités de constitution d'un réservoir.	47
<input type="checkbox"/> Probabilités d'émission d'aérosols.	47
II-3) L'OXYDATION HYDROTHERMALE (OXYDATION FROIDE)	47
II-3-1) Déchets potentiellement traités :	47
II-3-2) Analyse des installations d'oxydation hydrothermale :	48

II-4) LES TRAITEMENTS BIOLOGIQUES DES EFFLUENTS URBAINS OU INDUSTRIELS.....	48
II-4-1) Description succincte et données générales.....	48
<input type="checkbox"/> Le procédé.....	48
<input type="checkbox"/> Les déchets traités	49
II-4-2) Analyse des STEP.....	50
<input type="checkbox"/> Probabilités de constitution d'un réservoir.....	50
<input type="checkbox"/> Probabilités d'aérosolisation.....	51
II-5) LES TRAITEMENTS BIOLOGIQUES DES DECHETS SOLIDES – le compostage.....	53
II-5-1) Description succincte et données générales.....	53
<input type="checkbox"/> Le procédé.....	53
<input type="checkbox"/> Les déchets traités.....	54
II-5-2) Analyse des installations de compostage.....	54
<input type="checkbox"/> Probabilités de constitution d'un réservoir.....	54
<input type="checkbox"/> Probabilités d'aérosolisation.....	55
III) Points a retenir	56
H. RECHERCHE DE <i>LEGIONELLA</i> DANS LES BOUES ENTRANTES ET LES COMPOSTS D'UN CENTRE DE COMPOSTAGE.....	61
I) Introduction.....	61
II) Nature des échantillons et modalités de prélèvement.....	61
<input type="checkbox"/> Concernant les boues :.....	61
<input type="checkbox"/> Concernant les composts :.....	61
<input type="checkbox"/> Autres échantillons :	62
III) Réalisation des analyses.....	62
<input type="checkbox"/> Pré-traitement des échantillons :	62
<input type="checkbox"/> Dénombrement des <i>Legionella species</i> et des <i>Legionella pneumophila</i> :	62
IV) Résultats.....	63
V) Conclusions	66
I. CONCLUSIONS GENERALES	67

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Protozoaires constituant des hôtes potentiels dans l'environnement pour les bactéries de l'espèce Legionella pneumophila (selon Molmeret, 2001 et Ha, 2005).</i>	19
<i>Tableau 2 : Liste des espèces recensées de Legionella (Nombre de sérogroupes, implication dans les cas cliniques, capacité à infester des amibes) – d'après Ha, 2005 et EPA, 1999.</i>	22
<i>Tableau 3 : Les différentes formes cliniques de légionellose (EPA, 1999 ; D'après Navarrot, 2003).</i> .	25
<i>Tableau 4 : Les différentes localisations extra-pulmonaires d'infections à Legionella (D'après Navarrot, 2003 ; EPA, 1999).</i>	25
<i>Tableau 5 : Cas groupés de légionellose de Harnes, répartition (n analysés versus n positifs) en fonction des catégories d'échantillons.</i>	35
<i>Tableau 6 : Cas groupés de légionellose de Harnes, taux d'attaque observés en fonction de la distance au foyer de contamination.</i>	36
<i>Tableau 7 : Cas groupés de légionellose de Harnes, sources potentielles d'aérosols infectieux et rôle envisagé dans l'épidémie.</i>	38
<i>Tableau 8 : Familles de déchets regroupées par type de traitement (Damien, 2004)</i>	41
<i>Tableau 9 : Les différentes catégories de boues, siccités et procédés utilisés (Damien, 2004)</i>	43
<i>Tableau 10 : Détails des opérations susceptibles de générer des aérosols au niveau des procédés d'épuration des eaux usées (le traitement tertiaire n'est pas abordé).</i>	52
<i>Tableau 11 : Etude de cas, récapitulatif des dénombrements par culture et par PCR quantitative obtenus à partir des boues entrantes.</i>	64
<i>Tableau 12 : Etude de cas, caractéristiques des composts étudiés.</i>	65
<i>Tableau 13 : Etude de cas, récapitulatif des dénombrements par culture et par PCR quantitative obtenus à partir des composts criblés en phase de maturation.</i>	65

Liste des figures

<i>Figure 1 : Photographie d'une observation microscopique de Legionella</i>	<i>21</i>
<i>Figure 2 : Les facteurs qui influencent la survie des aérosols bactériens.....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 3 : Schéma de principe des différents procédés mis en œuvre sur une usine d'incinération. Source : CAMARD et FRANCONI, 2005.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 4 : Schéma de principe d'une station d'épuration classiquement rencontrée en France. (Document INRS)</i>	<i>49</i>
<i>Figure 5 : Evolution de la température, du pH et du type de micro-organismes lors du processus de compostage des déchets (d'après Mustin, 1987).</i>	<i>55</i>
<i>Figure 6 : Etude de cas, modalités de prélèvement et de fractionnement des échantillons pour la réalisation des analyses.</i>	<i>63</i>

Liste des abréviations

ARN :	Acides RiboNucléiques
CNRL :	Centre National de Référence des <i>Legionella</i>
DASRI :	Déchets d'Activités de Soins à Risques Infectieux
DBO ₅ :	Demande Biologique en Oxygène sur 5 jours.
DMI :	Dose Minimale Infectante
EPA :	Environmental Protection Agency
FISH :	Fluorescent In Situ Hybridization
ID ₅₀ :	Dose Infectieuse 50
LD ₅₀ :	Dose Létale 50
L. p. :	<i>Legionella pneumophila</i>
L. p. sg 1 :	<i>Legionella pneumophila</i> séro groupe 1.
L. spp. :	<i>Legionella species</i>
OAF :	Open Air Factors
OHT :	Oxydation HydroThermale
PCR :	Polymerase Chain Reaction
STEP :	STation d'EPuration
TARs :	Tours AéroRéfrigérantes
UFC :	Unité Formant Colonie
UG :	Unité Génomique
UIOM :	Usine d'Incinération d'Ordures Ménagères
UV :	Ultra-Violet
VBNC :	Viable But Not Cultivable

A. CONTEXTE GENERAL ET OBJECTIFS DE L'ETUDE.

L'augmentation de la population et l'intensification des activités industrielles ou agricoles, sont deux phénomènes étroitement liés et caractéristiques du siècle dernier. L'accroissement très significatif des quantités de déchets (biodégradables ou non), est une conséquence directe qui a nécessité une « organisation » de leur traitement à la mesure des quantités produites. Par ailleurs, la généralisation du traitement des eaux usées ou la mise en place de procédés de dépollution des gaz ou des sols conduit à la production de déchets secondaires qui contribuent également à augmenter les volumes de déchets à traiter. Ainsi, a-t-on assisté à la mise en place de filières spécifiques et dédiées au traitement des différentes catégories de déchets.

Les filières de traitement de déchets fournissent une réponse adaptée aux traitements efficaces de volumes importants ; tout en permettant de contrôler l'élimination de produits potentiellement dommageables pour les ressources naturelles et l'environnement, certaines permettent même à terme de fournir des produits valorisables. Les filières de traitement répondent donc à la fois à une problématique de dépollution et à une problématique économique (recyclage des matières premières, récupération des matériaux). Indispensables, les filières de traitement posent cependant le problème de leur impact sur l'environnement immédiat. **Ainsi, la question des effets des déchets sur la santé de l'homme et son environnement est souvent posée. Quel est le risque sanitaire encouru par les employés de ces filières, les riverains des centres de traitement ou bien encore les utilisateurs de produits valorisés ? Le sujet est vaste et peut-être envisagé sous différents aspects : chimiques, microbiologiques (virus, bactéries, parasites, champignons microscopiques, ...).** Il semble difficile d'apporter une réponse générale tant les filières, et donc leurs conséquences, peuvent être différentes. Cependant, la complexité et la sensibilité du sujet ne doivent pas nuire à l'évaluation des dangers, d'autant plus que les dispositions réglementaires récentes en matière de traitement des déchets insistent notamment sur la nécessité d'informer le public sur les effets pour l'environnement et la santé publique des opérations de production et d'élimination des déchets, ainsi que sur les mesures destinées à en prévenir ou en compenser les effets préjudiciables (code de l'environnement).

Dans ce contexte, il semble nécessaire d'étudier, point par point, les différents dangers identifiés. La légionellose apparaît comme un sujet d'étude légitime des dangers liés aux aspects microbiologiques ; aussi le travail présenté ici est entièrement focalisé sur l'évaluation des dangers en relation avec la présence de *Legionella* dans les matrices déchets. Cette problématique est directement liée à une volonté de mieux contrôler les opérations de traitement de dépollution et de stockage (protection de l'environnement, de la santé des travailleurs et des populations).

La présente étude a pour objectif d'engager une réflexion permettant de préciser les dangers liés à la présence et/ou à la multiplication de *Legionella* dans les déchets. Dans une première phase, il s'agit de réaliser un état des connaissances sur les données physiologiques et écologiques propices à la bactérie afin de les confronter aux conditions rencontrées au sein des processus de traitement des déchets et d'en tirer ainsi des hypothèses sur les filières de traitement les plus à risque. Afin de mieux évaluer le risque sanitaire lié aux bactéries *Legionella*, cette première partie bibliographique intégrera des informations générales sur la légionellose. Des travaux expérimentaux seront réalisés dans une seconde phase dite « d'étude de cas ». Cette dernière, comprendra d'une part la réalisation d'échantillonnages et d'autre part la mise en œuvre de modes opératoires destinés à la détection et au dénombrement des *Legionella* dans les échantillons collectés.

Pour toute information concernant la diversité des microorganismes présents dans les déchets, l'étude « Etat des connaissances sur les microorganismes dans la filière déchets » pourra être consultée (RECORD, 2003).

B. OBJECTIFS DU RAPPORT.

D'une manière générale, cette étude a pour but d'apporter des éléments sur le potentiel des installations de traitement de déchets à constituer, en tout ou partie, un réservoir des bactéries du genre *Legionella*. Plus largement et dans l'hypothèse que certaines installations puissent effectivement renfermer des réservoirs, il s'agit d'évaluer la possibilité que du personnel ou des riverains puissent être exposés à des aérosols potentiellement vecteurs de *Legionella*. Il s'agit donc d'initier les démarches qui permettront d'apporter les éléments d'information nécessaires pour mesurer le danger potentiel associé aux différentes filières de traitement en terme de légionellose. Ces données seront certainement profitables dans la mise en oeuvre d'une surveillance de l'installation pendant l'exploitation. Elles pourraient notamment être utiles à l'ensemble des démarches destinées à déterminer l'impact sanitaire des installations de traitement des déchets.

D'une manière plus spécifique, les objectifs de l'étude sont :

- d'apporter les informations générales permettant de situer le risque légionelle dans le contexte du traitement des déchets.
- d'apporter des réponses concernant la pertinence des méthodologies employées pour la recherche et le dénombrement des *Legionella* au sein d'un centre de traitement de déchets.
- d'apporter des réponses concernant les niveaux d'exposition au sein d'une structure de traitement de déchets.
- d'apporter des réponses concernant les mesures de prévention à mettre en oeuvre dans les différentes filières à risque.

C. RECHERCHE DES DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Dans une première étape, les bases de données bibliographiques ainsi que les moteurs de recherche ont été consultés pour rassembler les documents jugés les plus pertinents. La méthodologie de la recherche bibliographique est abordée dans le paragraphe suivant. La très large bibliographie dédiée aux *Legionella*, nous a permis de donner la priorité aux documents de synthèse (revues scientifiques, thèses de doctorat, ...). Les données disponibles concernant les procédés de traitement de déchets sont beaucoup plus rares. En particulier les données physico-chimiques (pH, température, humidité relative, ...), caractéristiques des différentes étapes qui se succèdent au sein des filières de traitement, ne semblent pas accessibles au travers des supports traditionnels de bibliographie.

La recherche bibliographique s'est effectuée sur les bases de données suivantes :

MEDLINE
GOOGLE
SCIENCE DIRECT
SUDOC
B.D.S.P (Banque de données santé publique)
SCOPUS
...

Des recherches sur des sites plus spécialisés ont également été réalisées, en particulier :

<http://www2.ademe.fr/>
<http://www.ast67.org/>
<http://www.cdc.gov/>
<http://www.ensp.fr/modules/myiframe/index.php?iframeid=3>

<http://www.epa.gov/>
<http://www.inrs.fr/>
<http://www.invs.sante.fr/>
<http://www.sante.gouv.fr/>
...

Deux ouvrages spécialisés dans le traitement des déchets ont été consultés :

Bernard TISSOT, 2004. Sécurité sanitaire et traitement des déchets : quels liens ? Rapport de l'académie des sciences Paris (octobre 2004). Ed. Lavoisier TEC & DOC 11 rue Lavoisier, 75384 Paris Cedex 08, 187 pp.

Alain DAMIEN, 2002. Guide du traitement des déchets, 3^{ème} Edition (2004). Ed. DUNOD, Paris. 431 pp.

Par ailleurs, un ouvrage dédié aux *Legionella* a également été exploité :

Sophie JARRAUD et Jean FRENEY, 2006. *Legionella* ; Monographie de microbiologie. Ed. Lavoisier TEC & DOC, 11 rue Lavoisier 75384 Paris Cedex 08, 192 pp.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

D. **LEGIONELLA ET LEGIONELLOSE.**

I) HISTORIQUE.

L'identification des *Legionella* en tant que genre bactérien est la conséquence directe d'une épidémie de légionellose d'envergure, identifiée aux Etats-Unis en 1976 : Alors qu'un congrès de l'American Legion réunis 4 400 participants à Philadelphie, l'hôtel Bellevue accueille quelques 600 de ces congressistes ainsi que la famille de certains. Rapidement, parmi les personnes séjournant dans cet hôtel ou ayant fréquenté la rue voisine, 200 cas de pneumonie, dont 44 fatals, sont recensés (Fraser *et al.*, 1977). Bien que dans un premier temps l'origine exacte de la contamination resta mystérieuse, le système de climatisation de l'hôtel Bellevue fût rapidement identifié comme le vecteur de l'épidémie. Il faudra néanmoins attendre janvier 1977 pour que J. Mc DADE élucide l'origine précise en isolant la bactérie responsable : *Legionella pneumophila*. En rapport avec le nom de ce nouveau microorganisme pathogène, les pneumonies aiguës observées pendant cette épidémie furent alors regroupées sous le terme de légionellose qui s'est depuis imposé dans le vocabulaire médical pour décrire les pneumonies liées à cette bactérie. Suite à la découverte de la bactérie *Legionella pneumophila*, 5 épidémies de légionellose dont l'agent responsable n'avait pas été isolé dans un premier temps, ont ainsi pu être élucidées à posteriori. Il semble ainsi, que la première épidémie de légionellose aurait sévi en 1965 à l'hôpital St Elisabeth de Washington (81 cas de légionellose dont 14 décès – Lowry et Tompkins, 1993). Par ailleurs, toutes ont été mises en évidence aux Etats-Unis sauf une localisée en Espagne en 1973 dans la ville de Benidorm.

Toujours à partir de compléments d'études réalisés à posteriori, une épidémie impliquant *Legionella pneumophila* intervenue en 1968, soit 3 ans après la première épidémie de légionellose, fût singulière de par la spécificité des symptômes observés. En effet, les patients majoritairement constitués par les travailleurs d'un immeuble d'une ville du Michigan (le Oakland County Health Department), présentaient une fièvre accompagnée de syndromes respiratoires beaucoup moins sérieux que ceux observés dans les cas d'une légionellose classique. La ville de Pontiac dans laquelle se déroula cette épidémie sera à l'origine de la dénomination de la forme bénigne de la maladie : la fièvre de Pontiac.

L'ensemble des investigations menées, montreront que, en dehors du cadre épidémique, les bactéries du genre *Legionella* avaient déjà été mises en évidence dès 1943. Plusieurs cas sporadiques de légionellose auraient ainsi été identifiés en 1943, 1947 et 1959 (EPA, 1999). A ces dates déjà, une capacité de multiplication intra-cellulaire avait été soulignée entraînant un classement dans un genre bactérien voisin : les Rickettsies (Tatlock, 1944 ; Hebert *et al.*, 1980).

En révélant le fort pouvoir pathogène des *Legionella*, l'épidémie de 1976, marquera le début de nombreux travaux de recherche visant à mieux caractériser la bactérie, le but à terme étant bien sûr de se prémunir du risque sanitaire qui lui est associé. Aujourd'hui les *Legionella* sont très bien caractérisées, mais la légionellose demeure un problème de santé publique.

II) ECOLOGIE ET POUVOIR PATHOGENE.

II-1) ECOLOGIE DES *LEGIONELLA*.

II-1-1) *Legionella*, une bactérie strictement aquatique ou une bactérie hydro-tellurique ?

Bactérie ubiquiste à tropisme hydrique, *Legionella* est une bactérie essentiellement aquatique retrouvée dans les environnements naturels ou non. Les eaux de surface naturelles (lacs, rivières, fleuves), les eaux thermales (sources et installations des établissements thermaux), les réseaux d'eau domestique (réseaux d'eau froide et d'eau chaude sanitaire), ou encore les systèmes industriels (classiquement les systèmes de

refroidissement) sont autant de réservoirs potentiels. La présence de *Legionella* dans l'eau de mer est discutée car l'impact des fortes salinités sur la survie des *Legionella* est sujet à controverse (Heller *et al.*, 1998 ; Ha, 2005). Cependant, en dehors de la stricte notion du temps de survie des *Legionella* dans l'eau de mer, il doit être retenu qu'à l'occasion de plusieurs études, des *Legionella* ont déjà été mise en évidence dans des eaux de mer aux origines géographiques diverses (Ortiz-Roque et Hazen, 1987 ; Palmer *et al.*, 1993 ; EPA, 1999).

En dehors des milieux purement hydriques les *Legionella* sont également présentes dans des environnements humides : boues, sédiments et composts. Dès 1979, *Legionella gormanii* fût isolée des sols humides (Morris *et al.*, 1980). Plus récemment, *Legionella pneumophila* était également mise en évidence dans le sol (Wallis et Robinson, 2005). Par ailleurs, et bien qu'il ne s'agisse pas de *Legionella* cultivables sur milieu de culture, les méthodes de détection basées sur la biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence des *Legionella* dans des environnements inattendus. Ainsi des *Legionella* proches de *L. steigerwaltii* et *L. brunensis* ont été respectivement mises en évidence dans un sol de la toundra sibérienne et dans un sol composé notamment de scories d'un volcan d'Arizona. Un autre exemple est donné par la détection de *Legionella pneumophila* dans des sédiments de Caroline du sud (Jarraud et Freney, 2006). Steele *et al.*, 1990 évoquent également une espèce de *Legionella* essentiellement mise en évidence en Australie et dont le sol, plutôt que le milieu hydrique, serait la niche écologique.

Les concentrations de *Legionella* mises en évidence dans les matrices environnementales sont généralement faibles, en revanche elles peuvent être beaucoup plus élevées dans les installations domestiques, les installations de soins, les installations de loisirs et les installations industrielles (systèmes de refroidissement par voie humide en particulier).

A partir de leur réservoir naturel les légionelles peuvent contaminer les sites artificiels et proliférer dans la mesure où les conditions leur sont favorables.

Le niveau d'oxygène dissous ou la salinité d'un milieu, constituent des paramètres qui interviennent manifestement dans la survie des *Legionella*, cependant les données actuellement disponibles ne permettent pas de caractériser totalement leur impact. En revanche, le pH, la température et l'accès aux nutriments sont trois paramètres mieux étudiés, qui apparaissent fondamentaux pour le développement des *Legionella* dans un environnement donné :

II-1-2) Oxygène dissous dans le milieu

Il semble impossible aux *Legionella* de se développer dans des eaux dont la teneur en oxygène dissous serait inférieure à 2,2 mg/L (Wadowsky *et al.*, 1985). En revanche la survie (et non plus la multiplication) reste manifestement possible pour des quantités en oxygène dissous aussi faibles que 0,2 mg/L (Jarraud et Freney, 2006).

II-1-3) Conditions de salinité du milieu

Des milieux renfermant de faibles concentrations salines (de l'ordre de 1 à 5 g/l) pourraient être favorables à la survie des *Legionella* (Heller *et al.*, 1998).

Concernant les milieux à fortes concentrations salines, c'est à dire des concentrations proches de celle de l'eau de mer (environ 30 g/l), Heller *et al.*, 1998, révèlent qu'elles ne sont pas incompatibles avec la survie des *Legionella* à condition que la température du milieu aquatique considéré reste comprise entre 4 et 20°C. Des données convergentes sont disponibles dans l'étude de Ohno *et al.*, 2003. En effet, ces auteurs après avoir mis en suspension des *Legionella pneumophila* dans des sources japonaises d'eau chaude aux salinités naturellement importantes (proches de celle de l'eau de mer) ont mis en évidence le maintien de l'activité métabolique de la bactérie.

Les travaux des deux équipes citées ci-dessus tendent à montrer que plus que la salinité elle-même, c'est le couple salinité/température qui affecte la survie des *Legionella*.

II-1-4) Conditions de pH

Le pH optimal de croissance des *Legionella* serait proche de la neutralité avec une valeur de 6,9 (Ha, 2005). Cependant, **dans les écosystèmes naturels, *Legionella* tolérerait des pH compris entre 5,5 et 8,5** (EPA, 1999 ; Molmeret, 2001). Malgré l'existence de ces données, le rôle du pH reste un point peu évoqué dans la caractérisation des milieux favorables aux *Legionella*.

II-1-5) Conditions de température

Les températures favorables à la multiplication des légionelles sont comprises entre 25 et 45°C, tandis que des températures proches de 35°C semblent optimales. En dehors de cet intervalle de température, la multiplication des légionelles est d'autant plus difficile que la température du milieu qui les abrite s'éloigne des bornes minimum et maximum. La baisse des températures entraîne éventuellement un arrêt de la multiplication mais ne conduit pas à la perte de viabilité (dans la mesure où les températures restent positives). Au contraire les températures élevées (supérieures à 65°C) induisent une inactivation des *Legionella* (Ha, 2005). Au niveau des écosystèmes naturels, Fliermans (1985), établit la **présence de *Legionella* dans des eaux naturelles dont les températures sont comprises entre 5,7 et 63°C**. L'étude de Fliermans est intéressante dans le sens où elle se base sur des constatations environnementales et non sur des essais réalisés en laboratoire : La capacité des *Legionella* à survivre dans des milieux hydriques naturels aux températures très variées mais non extrêmes est un fait avéré, il est ainsi possible de les classer parmi les **bactéries mésophiles**. La composition de la paroi des *Legionella*, proche de celle des bactéries thermophiles, explique la résistance de la bactérie aux températures élevées (Rogers et Keevil, 1992 ; Palmer *et al.*, 1993 ; Fliermans, 1996 ; Molmeret, 2001).

II-1-6) Accès aux nutriments : les *Legionella* sous la dépendance de la flore associée.

L'accès aux nutriments constitue certainement le point essentiel pour la prolifération des *Legionella*. Ceci tient au fait que la bactérie est incapable de se développer en l'absence de certains composés. Les *Legionella* ne fermentent ni n'oxydent les hydrates de carbone et ont développé une alternative singulière qui consiste en l'utilisation des acides aminés en tant que source de carbone (Jarraud et Freney, 2006). Beaucoup d'acides aminés jouent par conséquent un rôle prépondérant dans la croissance des *Legionella* mais la L-cystéine apparaît comme le plus critique. Aussi et bien que *L. oakridgensis* et *L. spiritensis* soient capables de croître sans apport de L-cystéine, cet acide aminé est considéré comme indispensable au développement des *Legionella*. Par ailleurs, les *Legionella* sont également sensibles à la disponibilité dans le milieu en fer assimilable. La bactérie contrairement à d'autres micro-organismes, est incapable de se procurer ces deux éléments nutritifs via son propre métabolisme ; L'exigence en L-cystéine et en sels de fer est une caractéristique des *Legionella*. **Ces éléments sont apportés en tout ou partie par des conditions ambiantes particulières ou du fait de l'activité métabolique d'autres micro-organismes.**

□ Conditions ambiantes favorables :

Parmi les conditions physico-chimiques propices, on compte la présence de dépôts de sels métalliques, les conditions propices à la dissolution de métaux ou à la corrosion (States *et al.*, 1985 ; Stout *et al.*, 1985 ; Rogers *et al.*, 1994 ; Ha, 2005). La présence d'éléments minéraux tel que le zinc, le cobalt, le cuivre, le manganèse, le molybdène, le potassium, le valadium le magnésium serait également favorable (Reeves *et al.*, 1981).). **L'effet d'activateur de croissance n'est observé que pour des quantités limitées, les mêmes métaux devenant inhibiteurs au-delà d'un certain seuil propre à chacun.** Concernant le cuivre par exemple des concentrations supérieures à 50 µg/L protègeraient les réseaux d'une colonisation par les *Legionella* (Borella *et al.*, 2004).

□ Activités métaboliques

Les *Legionella* ont développé différentes stratégies pour satisfaire à leurs besoins en éléments nutritifs. Elles sont notamment capables d'établir des relations de mutualisme ou d'utiliser les ressources mis à disposition

au sein d'un biofilm. Par ailleurs, elles constituent au même titre que les autres bactéries des proies pour les protozoaires mais sont capables de détourner à leur profit la prédation dont elles sont victimes.

- *Mutualisme.*

Le métabolisme de nombreux micro-organismes est susceptible de fournir les nutriments indispensables aux légionelles. La bactérie est capable d'entretenir des relations variées avec différents types de micro-organismes. Par exemple, des situations de **mutualisme** ont été décrites entre des cyanobactéries photosynthétiques (*Fischerella*) et des *Legionella* (Tison *et al.*, 1980 ; Pope *et al.*, 1982 ; Bohach *et al.*, 1983, EPA, 1999). Certaines algues vertes (*Scenedesmus spp*, *Chlorella*, *Gleocystis*) seraient également à l'origine d'une stimulation de la croissance de *Legionella* dans des milieux aquatiques exposés à la lumière (EPA, 1999 ; Jarraud et Freney, 2006).

- *Ressources issues de l'activité métabolique d'autres microorganismes.*

Les microorganismes environnementaux d'une même niche écologique sont en compétition pour l'utilisation des éléments nutritionnels disponibles. En dehors des phénomènes de prédation qui impliquent des microorganismes particuliers, les populations présentes mettent également en place des interactions pour développer des stratégies de survie : Tandis que des synergies s'établissent entre différents genres bactériens, d'autres sécrètent des substances antibactériennes actives contre des compétiteurs éventuels. De nombreuses études traitent des interactions (synergiques ou antagonistes) existant entre la flore bactérienne associée et les *Legionella* (Rowbotham, 1986 ; Harf et Monteil, 1988 ; Ha, 2005).

La présence de certaines bactéries, *Acinetobacter spp*, *Alcaligenes spp* et *Flavobacterium spp*, pourrait favoriser la croissance des *Legionella spp* du fait d'un apport en fer et cystéine via leur métabolisme. (Wadowsky *et Yee*, 1983 ; Stout *et al.*, 1986). **S'il semble acquis que les *Legionella* soient capables d'exploiter des nutriments mis à disposition au sein d'une communauté de populations microbiennes, il doit cependant être rappelé que les interactions entre bactéries à l'intérieur d'un biofilm sont complexes de telle sorte qu'il est difficile d'établir une liste de bactéries dont la présence serait systématiquement favorable (ou au contraire défavorable) au développement des *Legionella*.**

Messi *et al.*, (2003) ont par exemple montré que les conditions ambiantes pouvaient modifier les relations entre une souche de *Legionella* et une souche de *Pseudomonas*. Ainsi, dans un milieu aquatique à 4°C la présence de la souche de *Pseudomonas* semble favorable à la croissance des *Legionella* alors qu'à 30°C, température plus favorable aux *Legionella*, la présence de la souche de *Pseudomonas* se traduit par une inhibition de la croissance des *Legionella*.

Certaines bactéries seraient néfastes au développement des *Legionella* : *Aeromonas spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Flavobacterium spp*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*. L'inhibition serait induite par la sécrétion de bactériocines ou bactériocines-like (Jarraud et Freney, 2006). Théorie appuyée par les travaux récents de Hechard *et al.*, (2005) lesquels ont isolé une bactériocine active contre les bactéries du genre *Legionella* à partir d'une souche de *Staphylococcus warneri*. La sécrétion de bactériocines est classiquement retrouvée chez les bactéries environnementales qui doivent se maintenir ou s'imposer face à d'autres bactéries de la même niche écologique. Des bactéries comme *Bdellovibrio* pourraient même entraîner la lyse des *Legionella* (Jarraud et Freney, 2006). Si les *Legionella* semblent manifestement incapables de produire des substances antibactériennes elles sont en revanche la cible potentielle de ces dernières.

En dehors de la sécrétion de bactériocines, des bactéries peuvent être préjudiciables à la croissance des *Legionella* du fait d'infestation de protozoaires susceptibles d'héberger et de multiplier les *Legionella*. Les bactéries *Burkholderia cepacia* et *Burkholderia pseudomallei* pourraient, comme les *Legionella*, se développer dans les amibes (Borella *et al.*, 2005). Beaucoup d'autres microorganismes capables de croissance dans les amibes sont évoqués dans la synthèse réalisée par Greub et Raoult (2004). Le développement des *Legionella* par parasitisme est maintenant abordé.

- Parasitisme.

En l'absence d'autres microorganismes, les *Legionella* sont capables de se maintenir dans un milieu mais ne peuvent manifester pas se multiplier (Abu-Kwaik *et al.*, 1998 ; Jarraud et Freney, 2006). Ainsi, le rôle déterminant de la flore associée est également lié au fait que les *Legionella* sont des **parasites intracellulaires opportunistes** (principalement de protozoaires – Abu-Kwaik *et al.*, 1998) et comme tout parasite, des hôtes leur sont nécessaires pour se multiplier.

Les amibes et les ciliés sont parmi les protozoaires les plus susceptibles d'abriter des *Legionella* ; les hôtes les mieux connus sont deux amibes (*Acanthamoeba hartmannella*, *Naegleria spp*), un protozoaire cilié (*Tetrahymena pyriformis*) et une moisissure (*Dictyostelium discoideum* – Steele et McLennan, 1996 ; Solomon *et al.*, 2000). Au moins 13 espèces d'amibes constituent des hôtes potentiels pour l'une des 48 espèces de *Legionella* (Abu-Kwaik *et al.*, 1998). Cependant toutes les espèces de *Legionella* ne sont pas susceptibles d'établir une infestation amibienne (Greub et Raoult, 2004). Les tableaux 1 et 2 présentent les principaux hôtes connus des *Legionella* dans l'environnement, les différentes espèces de *Legionella* ainsi que leur capacité à infester ou non des amibes.

Tableau 1 : Protozoaires constituant des hôtes potentiels dans l'environnement pour les bactéries de l'espèce *Legionella pneumophila* (selon Molmeret, 2001 et Ha, 2005).

Types	Organismes	Types	Organismes
AMIBES	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	PROTOZOAIRESCILES	<i>Tetrahymena pyriformis</i>
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>		
	<i>Acanthamoeba palestinensis</i>		<i>Tetrahymena vorax</i>
	<i>Acanthamoeba royreba</i>		<i>Cyclidium spp.</i>
	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>		
	<i>Naegleria gruberi</i>		
	<i>Naegleria fowleri</i>		
	<i>Naegleria lovaniensis</i>		
	<i>Naegleria jadini</i>		
	<i>Hartmanella vermiformis</i>		
	<i>Hartmanella cantabrigiensis</i>		
	<i>Vahlkampfia jugosa</i>		
	<i>Echinamoeba exudans</i>		

Dès 1980, les travaux de Rowbotham montraient la capacité de *Legionella pneumophila* à infester les amibes libres des genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* (Rowbotham, 1980). Les amibes infestées sont le lieu d'une multiplication intense : des vésicules amibiennes contenant des centaines de *Legionella* peuvent être secrétées avant que l'amibe ne finisse par être lysée.

Les amibes libres s'opposent aux autres amibes de par leur capacité à se développer dans le milieu naturel en l'absence d'hôte spécifique. Souvent appelées amibes du sol, elles sont présentes dans tous les compartiments hydriques (eaux douces, naturelles ou marines) mais aussi dans les sols humides. Aussi, selon Freney (Jarraud et Freney, 2006), « il semble admis aujourd'hui que le principal vecteur de multiplication de ces bactéries - « *Legionella* » - dans les environnements aquatiques et les sols humides soit

représenté par différents protozoaires et notamment les amibes libres ». De plus, il semble que la multiplication intra-amibienne soit favorable à un accroissement de la virulence des *Legionella*.

Le parasitisme des amibes (puis d'autres protozoaires) par *Legionella pneumophila* a été largement étudié et confirmé (Cf tableau 1). La capacité des autres espèces de *Legionella* à infester des protozoaires a été moins étudiée cependant des données expérimentales montrent qu'au moins 7 espèces autres que *pneumophila* sont capables de parasiter des amibes (Cf. tableau 2). Parmi ces travaux, ceux de Fields et al., (1986) ont par exemple permis d'étudier le parasitisme de *Tetrahymena pyriformis* par 11 espèces de *Legionella* différentes. Il s'est ainsi avéré que toutes les espèces testées n'étaient pas capables de réaliser l'infestation de ce cilié. La synthèse réalisée par Greub et Raoult (2004) fait également apparaître que parmi les hôtes de *L. pneumophila* répertoriés, tous ne sont pas susceptibles d'être infestés par des espèces de *Legionella* autres que *pneumophila*. Ainsi **il se pourrait que les relations de parasitisme entre les *Legionella* et les protozoaires soient limitées à certaines espèces**. Deux hypothèses se dégagent alors, soit les espèces de *Legionella* autres que *pneumophila* sont moins aptes à parasiter les protozoaires que *L. pneumophila*, soit elles parasitent d'autres types de protozoaires... Les travaux menés sur l'infestation des protozoaires par des *Legionella* autres que *pneumophila* sont semble-t-il trop restreints pour répondre à cette question.

Pour synthétiser l'état des connaissances actuelles, la capacité de certaines espèces de *Legionella* à infester au moins un protozoaire est renseignée dans le tableau 2 ; il s'agit d'une synthèse des données disponibles aussi concernant les amibes pour lesquelles aucun hôte n'a été identifié il doit être gardé à l'esprit que les travaux sur ce sujet et ne sont pas exhaustifs et sont donc susceptibles d'évoluer. Par ailleurs la capacité de certaines *Legionella* à infester une amibe donnée n'implique pas que cette infestation puisse être réalisée pour d'autres espèces d'amibes. Les phénomènes de prédation associés aux amibes ne doivent donc pas être sous-estimés.

- Le cas particulier des biofilms

« Le biofilm est une communauté microbienne hétérogène complexe adhérant et se multipliant sur une interface eau/support inerte et enchevêtrée au sein d'une matrice d'exobiopolymères hautement hydratée » (Delery et al., 2006).

La forte exigence des *Legionella* vis à vis de nombreux nutriments (L-cystéine, sels de fer, ...) contraste avec leur présence dans la plupart des environnements hydriques naturels. Par ailleurs et comme évoqué précédemment la question du mode de multiplication des *Legionella* en dehors de tout phénomène de parasitisme est mal connue. L'environnement particulier constitué par les biofilms apparaît comme l'environnement le plus favorable à une multiplication des *Legionella* ou du moins à leur survie. Ainsi selon Murga et al., 2001, les exigences en nutriments des *Legionella* et leur statut de parasite intra-cellulaire justifient qu'elles semblent **incapables de proliférer dans un environnement dépourvu d'hôtes sauf dans certains biofilms complexes**.

En présence de biofilm, les phénomènes liés à la flore associée sont amplifiés :

- **du point de vue des relations de commensalisme, la diversité des micro-organismes permet la dégradation rapide des matières organiques véhiculées par l'eau ou amenées par des substrats solides**. Les bactéries exigeantes comme les *Legionella* trouvent les nutriments indispensables à leur multiplication (L-cystéine par exemple) du fait de l'activité métabolique des autres bactéries moins exigeantes.

- **du point de vue du parasitisme, les biofilms très riches en bactéries, abritent également de nombreux protozoaires qui s'en nourrissent. Parmi ces protozoaires se trouvent généralement des hôtes potentiels des *Legionella*. La formation des biofilms est d'autant plus facile et rapide que le milieu est peu turbulent, ainsi les eaux stagnantes favorisent ce phénomène**.

Certains matériaux sont plus propices au développement des biofilms. Le caoutchouc, le chlorure de polyvinyle, le polyéthylène, le silicone sont répertoriés parmi ces matériaux (CSHPF, 2001).

Vraisemblablement pour les mêmes raisons que celles évoquées pour les biofilms (accès aux nutriments, hôtes en quantité importante), la présence de boues ou sédiments est considérée comme un élément favorisant la présence des *Legionella* (Stout *et al.*, 1985).

II-2) TAXONOMIE ET POUVOIR PATHOGENE.

II-2-1) Eléments de taxonomie, critères d'identification (Jarraud et Freney, 2006).

Les *Legionella* appartiennent aux gamma-proteobactéries, ordre des *Legionellales* contenant lui-même deux familles, celle des *Coxiellaceae* et celle des *Legionellaceae*. La famille des *Legionellaceae* abrite le genre des *Legionella* qui se subdivise en 48 espèces dont certaines se déclinent en sérogroupes parfois nombreux (15 sérogroupes chez *Legionella pneumophila*) ; on compte actuellement 70 sérogroupes répartis sur 48 espèces.

La morphologie des *Legionella* est complexe à décrire. En effet, suivant le contexte, la bactérie peut présenter des aspects variables. Typiquement, les *Legionella* sont des bacilles aérobies d'environ 2 µm de long sur 0,3 à 0,9 µm de large. Dans les tissus infectés ou dans les sécrétions les *Legionella* apparaissent plutôt comme des coccobacilles de taille réduite. Les observations réalisées à partir de culture sur milieu gélosé montrent au contraire des bactéries allongées et filamenteuses d'environ 20 µm de longueur.



Figure 1 : Photographie d'une observation microscopique de *Legionella*

<http://www.repower.ch/INimg/Newsletter/legionella.jpg>

La composition de la membrane des *Legionella* est particulière. Malgré la présence d'une forte proportion d'acides gras ramifiés, normalement rencontrés dans les membranes des bactéries Gram +, la coloration selon Gram appliquée aux *Legionella* fait apparaître un profil négatif (faible coloration cependant). La coloration de Zielh-Nelsen ne permet pas la mise en évidence des *Legionella*.

Plus précisément, les *Legionella* étant généralement mobiles, des flagelles sont couramment observés en position polaire ou latérale. Certaines espèces comme *L. londiniensis*, *L. nautarum*, *L. oakridgensis* en sont cependant dépourvues.

Du point de vue du métabolisme enzymatique classiquement utilisé pour les identifications des bactéries, les *Legionella* possèdent une activité catalase et la majorité d'entre elles une activité gélatinase ; en revanche, elles n'expriment pas ou peu d'activité oxydase, nitrate réductase ou uréase.

A noter que les exigences spécifiques en sels de fer et surtout en L-cystéine sont classiquement utilisées pour confirmer l'appartenance de culture bactérienne au genre *Legionella*.

Dans le tableau II est notamment fournie la liste des espèces de *Legionella* capables de parasiter au moins une amibe. Cette liste n'est pas exhaustive car une évaluation systématique de la capacité de multiplication de chacune des espèces de *Legionella* dans différentes amibes n'a pas été réalisée. Il s'agit donc d'une description des éléments actuellement observés et rapportés dans la bibliographie.

Tableau 2 : Liste des espèces recensées de *Legionella* (Nombre de sérogroupes, implication dans les cas cliniques, capacité à infester des amibes) – d'après Ha, 2005 et EPA, 1999.

ESPECES		ESPECES	
<i>L. adelaidensis</i>	<i>L. fairfieldensis</i>	<i>L. londiniensis</i> (2)	<i>L. rowbothamii</i>
<i>L. anisa</i> *	<i>L. fallonii</i>	<i>L. longbeachae</i> * (2)	<i>L. rubrilucens</i>
<i>L. beliardensis</i> *	<i>L. geestiana</i>	<i>L. lytica</i> *	<i>L. sainthelensi</i> * (2)
<i>L. birminghamensis</i> *	<i>L. genomospecies</i>	<i>L. macaechnii</i> * (syn : <i>Tatlockia macaechnii</i>)	<i>L. santicrusis</i> *
<i>L. bozemanii</i> * (2) (syn : <i>Fluoribacter bozemaniae</i>)	<i>L. gormanii</i> * (syn : <i>Fluoribacter gormanii</i>)	<i>L. micdadei</i> * (syn : <i>Tatlockia micdadei</i>)	<i>L. shakespearei</i>
<i>L. brunensis</i>	<i>L. gratiana</i> *	<i>L. moravica</i>	<i>L. spiritensis</i> (2)
<i>L. cherrii</i> *	<i>L. gresilensis</i>	<i>L. nautarum</i>	<i>L. steigerwaltii</i>
<i>L. cincinnatiensis</i> *	<i>L. haeckeliae</i> * (2)	<i>L. oakridgensis</i> *	<i>L. taurinensis</i>
<i>L. donaldsonii</i>	<i>L. israelensis</i>	<i>L. parisiensis</i> *	<i>L. tusconensis</i> *
<i>L. drozanskii</i>	<i>L. jamestowniensis</i>	<i>L. pneumophila</i> * (15)	<i>L. wadsworthii</i> *
<i>L. dumoffii</i> * (syn : <i>Fluoribacter dumoffii</i>)	<i>L. jordanis</i> *	<i>L. quateirensis</i>	<i>L. waltersii</i>
<i>L. erythra</i> * (2)	<i>L. lansingensis</i> *	<i>L. quinlivanii</i> * (2)	<i>L. worsleiensis</i>

(n) : nombre de sérogroupes par espèce.

en gras : espèces capables de parasiter au moins une amibe (selon tableau II-1, EPA 1999)

* Espèces déjà associées à des cas cliniques (environ 20 espèces pathogènes)

II-2-2) Pouvoir pathogène

□ Influence de l'isolat bactérien.

La pathogénicité des *Legionella* est clairement liée à l'appartenance à une espèce voire à un sérotype. Ainsi, en 2003, 99 % des légionelloses diagnostiquées étaient le fait de *L. pneumophila*, plus précisément encore, le sérotype 1 de *L. pneumophila* regroupait à lui seul 89 % de ces légionelloses (Campese *et al.*, 2004)...

Les sérotypes 3 et 6 sont considérés comme les plus virulents après le sérotype 1.

***Legionella pneumophila* apparaît donc comme l'espèce la plus virulente**, mais *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* sont régulièrement impliquées dans des cas de légionellose. *L. longbeachae* est également décrite comme une cause majeure en Australie (Steele, 1989). Si quelques espèces regroupent l'énorme majorité des cas de légionellose, un peu moins de la moitié des 48 espèces recensées a déjà été associée à la pathologie (cf. tableau 2).

□ Dose infectieuse.

Les animaux ne semblent pas être naturellement sujets à la légionellose. Cependant en laboratoire, des infections provoquées sont possibles chez les cobayes qui constituent le principal modèle animal. Les caractéristiques de la maladie artificiellement provoquée chez cet animal sont en effet très proches de celles rencontrées au cours des légionelloses humaines. Des doses létales 50 (LD₅₀) et des doses infectieuses 50 (ID₅₀) ont été déterminées chez le cobaye pour une exposition à *Legionella pneumophila* par aérosols.

La revue de l'EPA (1999) synthétise les données sur le sujet et indique une première ID₅₀ de 20 UFC ainsi qu'une seconde établie comme étant « inférieure à 129 bactéries ». De même, les LD₅₀ mentionnées fluctuent et oscillent d'une gamme de 5.10² à 5.10³ UFC pour une première étude, jusqu'à que des quantités de 1.10⁴ à 1,4.10⁵ bactéries pour deux autres études.

Les données chez l'homme sont inexistantes, et les quelques valeurs recueillies sur les modèles animaux ne peuvent être transposées en l'état. En effet, de fortes variations de la dose infectieuse peuvent survenir en fonction des hôtes.

La dose minimale infectante (DMI) n'est donc pas connue. Les difficultés à l'estimer ont pour origine :

- l'absence de données chez les hommes, puisque les études réalisées à ce sujet ont principalement impliqué des modèles animaux (Berendt *et al.*, 1980 ; Baskerville *et al.*, 1981, Davis *et al.*, 1982).
- les différences de sensibilité individuelle et les différences de virulence (non seulement au niveau des espèces de *Legionella* mais aussi au niveau des sérotypes et même au niveau des isolats).

La question du rôle des amibes en tant que réservoir environnemental des *Legionella* est maintenant largement évoquée (§ II-1-6). Des observations ont montré que les amibes infestées par les *Legionella* pouvaient générer des vésicules de petites tailles (respirables), stables dans les conditions environnementales et contenant des quantités importantes de la bactérie. La possibilité que ces vésicules puissent au cours d'une inhalation, apporter des quantités de *Legionella* en rapport avec la DMI a été évoquée (Berk *et al.*, 1998).

Une étude dose-réponse permettrait dévaluer la DMI, cependant Tissot (2004) dans son ouvrage soulève les problèmes posés par de telles études sur le terrain :

- Estimation trop approximative des populations concernées (riverains, travailleurs, utilisateurs). De plus, la détermination d'une DMI via l'exposition de volontaires n'est éthiquement pas envisageable étant donné la gravité de la légionellose.
- Difficulté également de la caractérisation des expositions : pour obtenir des informations sur la notion de dose-réponse il faudrait être en mesure d'apprécier la dose délivrée dans l'environnement de la personne exposée. Le choix des modalités à mettre en œuvre pour la détermination de l'exposition est une source de difficultés. En effet, l'exposition des aérosols aux conditions environnementales semble conduire rapidement à la perte de cultivabilité des *L. pneumophila* aérosolisées, alors que leurs fonctions physiologiques demeurent : L'aérosolisation engendre rapidement un état viable non cultivable dont il conviendrait d'explorer l'impact sanitaire : Quel risque infectieux peut être attaché à cet état viable mais non cultivable sur gélose ? La question de l'outil analytique permettant de mesurer la dose d'exposition doit donc être posée pour répondre au mieux aux interrogations liées à la DMI.

Selon Tissot (2004), « l'épidémiologie environnementale atteint actuellement des limites que les évolutions méthodologiques permettent parfois de contourner ou d'éliminer, mais pas toujours. Ces limites sont difficiles à faire comprendre aux citoyens et aux décideurs tant ils pressent et militent pour une obligation de réponse sans vouloir prendre en compte les incertitudes attachées à l'état des données scientifiques ».

La forme sévère de la maladie (légionellose) atteint les personnes au système immunitaire fragilisé. Parmi les facteurs de risques répertoriés se trouvent, le suivi d'un traitement immunosuppresseur, les corticothérapies, les chimiothérapies anticancéreuses, les immuno-dépression. Les insuffisances respiratoires chroniques, le tabagisme chronique, l'alcoolisme chronique mais aussi le diabète, l'âge (> 50 ans) et le sexe masculin aggravent également le risque de contracter la maladie (Granguillot, 2004)

Sur ce dernier point, et en dehors, des populations à risque clairement identifiées que dire de l'impact des affections respiratoires classiquement répertoriées parmi les travailleurs des filières de traitement des déchets. Une sensibilisation allergique des voies respiratoires ou des affections chroniques ne pourraient-elles pas installer un terrain favorable à une infection par *Legionella* ? **La possibilité d'effets synergiques ne doit pas être négligée, l'exposition à un polluant pouvant accroître la sensibilité à un autre polluant fût-il de nature microbiologique (Lewis, 2002). A titre d'exemple des affections pulmonaires plus ou moins sévères ont déjà pu être constatées au niveau des centres de traitement de déchets (Wouters et al., 2002 ; Heldal et al., 2003 ; Thorn et Beijer, 2004).**

II-2-3) Tableau clinique

Le tableau 3 présente les conséquences de chacune des deux formes d'infection que peut entraîner la bactérie.

La légionellose ou maladie du légionnaire est une pneumopathie aiguë qu'il est parfois difficile de différencier des autres pneumonies d'origine bactérienne (Roig et al., 1994). La fièvre de Pontiac est une maladie non pneumonique de type grippal qui peut se définir comme une forme fébrile d'évolution bénigne (guérison spontanée en 2 à 5 jours). Les localisations en dehors de l'arbre respiratoire sont rares mais possibles, elles entraînent des symptômes variés en relation avec le site d'infection. Dans la majorité des cas, la forme extra-pulmonaire s'ajoute à une forme respiratoire mais l'association n'est pas obligatoire : des cas d'infections extra-pulmonaires ont été décrits en l'absence de symptômes respiratoires (Edelstein, 1993). Le tableau 4 présente les différentes localisations extra-pulmonaires déjà répertoriées.

Aux Etats-Unis, Marston et al., en 1997, estimaient que la légionellose était responsable de 2 et 4% des pneumonies communautaires nécessitant une hospitalisation. Pour l'année 2004, en France, ce taux était annoncé à une valeur comprise entre 5 et 15% et la létalité associée était évaluée à 14% (BEH, 2004).

Tableau 3 : Les différentes formes cliniques de légionellose (EPA, 1999 ; D'après Navarrot, 2003).

Types de pathologie ou caractéristiques	Légionellose	Fièvre de Pontiac
Taux d'attaque	Faible	90%
Mortalité	15-20%	0%
Période d'incubation	2 à 10 jours	1 à 2 jours (inférieure à 48 H)
Symptômes	Fièvre, toux, myalgies, maux de tête, douleurs thoraciques, diarrhées, confusion	Syndrome grippal : fièvre, toux, myalgie
Poumon	Pneumopathie, pleurésie, abcès pulmonaire	Absence de pneumopathie et d'abcès pulmonaire
Rein	Désordres rénaux : protéinurie, hématurie, insuffisance rénale	Absence de manifestation
Foie	Peu d'anomalie	Absence de manifestation
Tractus gastro-intestinal	Diarrhées aqueuses, douleurs abdominales, nausées, vomissements	Absence de manifestation
Système nerveux central	Somnolence, délire, désorientation, confusion	Absence de manifestation

Tableau 4 : Les différentes localisations extra-pulmonaires d'infections à *Legionella* (D'après Navarrot, 2003 ; EPA, 1999).

Localisations extra-pulmonaires (possibles mais rares)
Atteintes hématologiques
Atteintes neurologiques
Atteintes rénales
Atteintes cardiaques : myocardite, péricardite, endocardite
Atteintes musculaires
Localisation digestive
Rétinite
Sinusite

III) MODE DE CONTAMINATION.

Aucune contamination inter-humaine n'a pu être mise en évidence à ce jour. Actuellement les animaux ne sont pas considérés comme des réservoirs potentiels de la bactérie. Fabbi *et al.*, (1998) soulignent l'échec de 8 études indépendantes à démontrer l'existence d'infections à *Legionella* chez des animaux sauvages ou domestiques. Ainsi, l'étude de la séroprévalence chez des animaux aussi variés que les antilopes, les chameaux, les pigeons, les buffles ou chez des chevaux, des chèvres, des moutons, des chiens, des lapins, du bétail, n'a pas montré que ces animaux pouvaient majoritairement contracter une infection à *Legionella*. Les chevaux apparaissent cependant avec la plus forte séroprévalence. Les mêmes travaux italiens (Fabbi *et al.*, 1998) relatent cependant en détails l'infection fatale d'un jeune veau par *L. pneumophila* sg 1 et sg 10. Les animaux n'apparaissent manifestement pas comme un réservoir important de la bactérie, cependant des infections sporadiques sont possibles.

L'air constitue la voie de propagation de la bactérie : la contraction d'une légionellose se fait exclusivement par l'inhalation d'un aérosol bactérien formé à partir d'un réservoir colonisé.

L'aérosolisation d'une matrice contaminée n'est cependant pas une condition suffisante à la transmission aérienne de la bactérie. Des paramètres aussi variés que les conditions de l'aérosolisation, les conditions physico-chimiques ambiantes, la nature des *Legionella* présentes (virulence variable en fonction des espèces – état physiologique variable), influent sur les risques de transmission.

III-1) CONDITIONS D'AÉROSOLISATION

La taille de l'aérosol, l'état physiologique des bactéries aérosolisées et la nature de la suspension à partir de laquelle l'aérosol est généré sont des paramètres importants.

III-1-1) Taille des aérosols

La multiplication des légionelles au niveau pulmonaire ne sera initiée que si l'aérosol transporte la bactérie jusqu'au plus petit niveau de ramification de l'arbre respiratoire, c'est à dire au niveau des alvéoles pulmonaires. Le faible diamètre des bronchioles constitue un obstacle à la progression des aérosols les plus gros, de sorte que **le risque de légionellose n'est avéré que pour des bioaérosols dont le diamètre n'excède pas 5 µm**. La taille de l'aérosol potentiellement infectant doit être mise en rapport avec celle des *Legionella* issues de l'environnement. Les bactéries du genre *Legionella* sont des bacilles (forme de bâtonnet), caractérisés par un diamètre de 0,3 à 0,9 µm et une longueur de 2 à 20 µm (Winn, 1988). La taille critique des aérosols potentiellement infectants étant proche de la taille d'une bactérie individualisée, la notion de bioaérosol prend alors tout son sens.

Dans les risques de transmission de légionellose, la taille des aérosols générés par une source de dissémination est un critère aussi important que la concentration des *Legionella* mises en suspension dans l'air.

III-1-2) Etat physiologique du micro-organisme avant aérosolisation

Les différences de virulence entre espèces ayant déjà fait l'objet du § II-2-2), l'attention est ici portée sur l'état physiologique des *Legionella* susceptibles d'être aérosolisées.

Hambleton *et al.*, (1983) soulignent que la résistance de *Legionella* aérosolisées est différente en fonction du stade de culture. Les *Legionella* soumises aux conditions de croissance les moins favorables (phase stationnaire) forment des bioaérosols plus stables que des *Legionella* en phase de multiplication. Par ailleurs, ces observations sont en cohérence avec le fait que les *Legionella* adaptent leur métabolisme aux conditions ambiantes de sorte à accroître leur virulence quand les conditions leur sont moins favorables. Dennis et Lee, en 1988 constatent également, après aérosolisation de trois isolats distincts de *L. p. 1*, que la survie des souches est en relation avec leur virulence : bien qu'il s'agisse de trois isolats d'espèces et de sérogroupes identiques, les survies

observées sont différentes et sont en corrélation avec la virulence des souches préalablement mises en évidence sur des modèles animaux.

Les différents travaux menés et les observations qui en découlent, laissent à penser que les *Legionella* survivent d'autant mieux sous forme d'aérosol que leur virulence initiale est importante.

Les vésicules amibiennes secrétées pendant la phase de multiplication des légionelles dans l'amibe et avant la lyse de celle-ci présenteraient un diamètre compris entre 2,1 et 6,4 µm de sorte que ces vésicules pourraient intégrer la fraction inhalable. En raison de la présence de nombreuses *Legionella* par vésicule, les risques de contamination d'une personne exposée existent. En effet, en cas d'aérosolisation, les *Legionella* contenues dans une vésicule amibienne sont protégées de la dessiccation et en cas d'inhalation la vésicule pourrait apporter à elle seule une quantité de *Legionella* vraisemblablement suffisante pour initier une infection (EPA, 1999). Par ailleurs, comme déjà évoqué, la virulence des *Legionella* est accrue après multiplication intra-amibienne.

III-1-3) Nature de la suspension à partir de laquelle sont générés les aérosols

La composition de la suspension à l'origine de l'aérosol influence la survie des bactéries. Les molécules en solution, aérosolisées en même temps que les bactéries, peuvent augmenter ou réduire la survie des bioaérosols.

Lorsque des bioaérosols sont formés, la présence de chlorure de sodium dans une suspension de *Streptococcus pneumoniae* aérosolisés réduit leur survie (Ha, 2005) ; au contraire l'inositol, des di ou tri-saccharides favorisent la survie des bactéries gram négatif (Ha, 2005). La présence d'algues (*Fischerella spp*) dans une suspension aérosolisée stabilise la survie d'aérosols de *Legionella* (Berendt, 1981). Il s'agit là d'un exemple d'une influence indirecte d'un micro-organisme sur la survie des *Legionella*. L'hypothèse la plus probable pour expliquer l'effet stabilisant de certaines molécules en solution sur la survie des bioaérosols, est le rôle qu'elles joueraient, en surface des bactéries : certaines formeraient une barrière protectrice limitant les pertes en eau de la cellule au moment de l'aérosolisation, d'autres au contraire les accentueraient.

En l'état des connaissances, il est impossible de relier la nature d'un fluide industriel à un plus grand risque de transmission de bioaérosols infectieux du fait de la présence d'une molécule ou d'une autre dans ce fluide. Cependant il doit être gardé à l'esprit que la composition d'un fluide peut favoriser ou réduire la survie des bioaérosols qui en seraient issus.

III-2) CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES AMBIANTES APRES AEROSOLISATION

Pour la plupart des bactéries l'air est un milieu défavorable si bien que la survie associée à l'aérosolisation est généralement faible ; elle est liée :

au taux d'humidité relative de l'air.

à la température de l'air.

à la présence d'oxygène, d'ozone et des OAF (Open Air Factor).

à la présence de radiations (rayonnement solaire par exemple).

Berendt, 1980 souligne l'augmentation du temps de survie des cellules aéroportées avec l'augmentation de l'humidité relative. Une humidité relative de 65% est optimale pour la survie des *Legionella* aérosolisées (Hambleton *et al.*, 1983). La température de l'air exerce indirectement une influence sur la survie des bioaérosols de part son action sur l'humidité relative. De plus, en dehors de toute relation avec l'humidité relative, l'exposition à des températures élevées est source d'inhibition du métabolisme bactérien du fait de l'inhibition des réactions enzymatiques.

La toxicité de l'oxygène, essentiellement observée sur les bactéries à Gram négatif, dépend bien sûr de la proportion d'oxygène dans l'air mais également et encore une fois de l'humidité relative (Ha, 2005). Enfin, la présence d'ozone dans l'atmosphère réduit la survie des germes aérosolisés : la combinaison d'ozone et d'alcènes (issus par exemple de processus de combustion), conduit à un ensemble de produits regroupés sous l'appellation générique « Open Air Factor » (OAF) qui présentent une toxicité accrue pour les bioaérosols (Cox, 1989 ; Ha, 2005). Les rayonnements, en particulier ceux issus de l'ensoleillement, contribueraient à la létalité des bioaérosols. Ainsi, l'oxygène,

l'ozone ou les rayonnements concourent à un stress oxydatif qui se répercute sur le métabolisme bactérien. Les effets du stress oxydatif semblent s'accroître avec la déshydratation du micro-organisme.

Les caractéristiques physico-chimiques de l'atmosphère ambiante sont déterminantes dans la survie des bioaérosols. La figure 2 reprend les différents facteurs ambiants susceptibles d'intervenir sur la persistance dans le temps du caractère infectieux de bactéries aérosolisées.

Les conditions propres à l'air ambiant de chaque site industriel peuvent faciliter ou au contraire réduire la survie des *Legionella* aérosolisées.

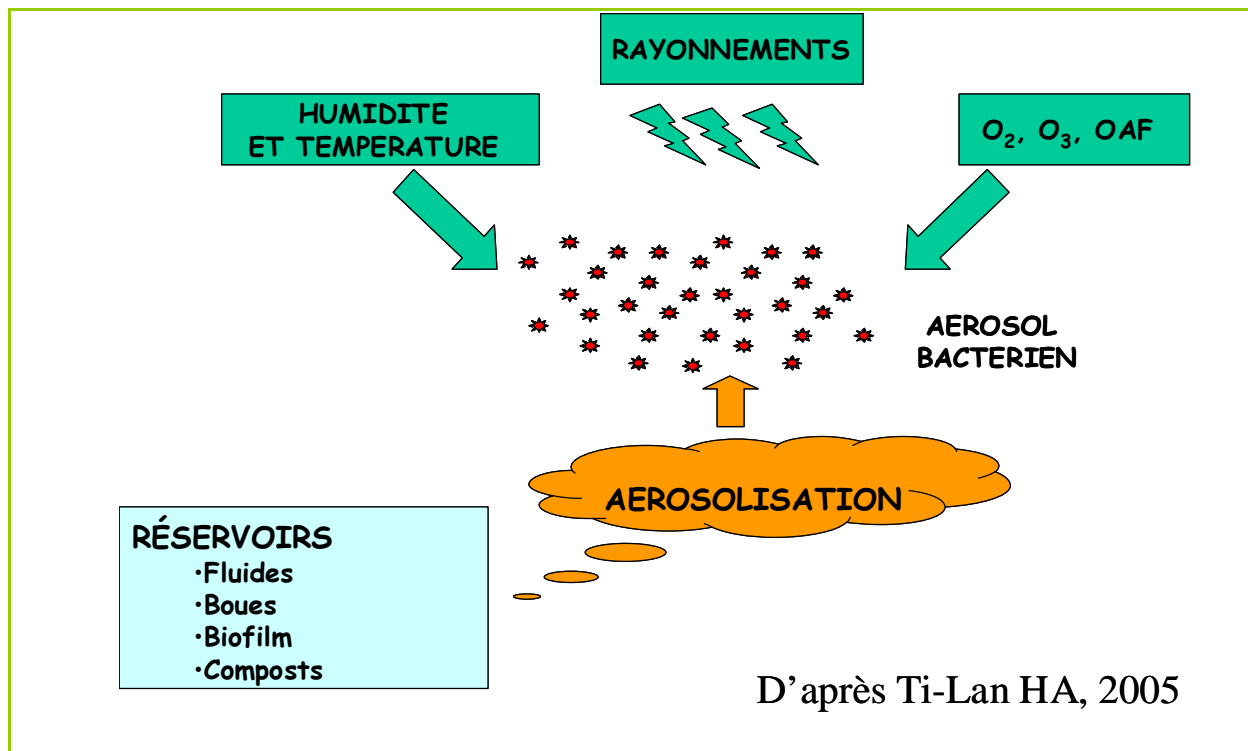


Figure 2 : Les facteurs qui influencent la survie des aérosols bactériens.

IV) PROFILS DES INSTALLATIONS A RISQUES

La synthèse des conditions écologiques et ambiantes favorables au développement des légionelles permet de cerner les caractéristiques d'une installation à risque.

Balty et Bayeux-Dunglas (2004), définissent une installation à risque comme une installation :

- qui comporte un réservoir ou un circuit d'eau à une température comprise généralement entre 25°C et 43°C, avec présence de nutriments et d'autres micro-organismes.
- qui présente un renouvellement d'eau lent, permettant aux *Legionella* de proliférer ; la stagnation de l'eau accentuant également la formation d'un biofilm dont la présence est favorable aux légionelles.
- qui émet des micro-gouttelles d'eau de taille inférieure à 5 µm par pulvérisation, bouillonnement ou impaction à forte pression sur une surface.

Cette définition traduit deux facteurs de risques prépondérants : Le premier étant la probabilité que l'installation renferme un réservoir, le second étant la probabilité que ce réservoir puisse générer des aérosols. L'absence de réservoir implique l'absence de bioaérosols infectieux. A l'analyse des données préalablement présentées ces deux facteurs de risques peuvent se décomposer en sous-facteurs.

Dans un ordre croissant, la probabilité qu'un réservoir de *Legionella* existe est liée :

- **au taux d'humidité de la matrice considérée. Plus la matrice est humide et plus elle est favorable aux légionelles.**
- **aux conditions de pH et de températures (favorables ou non).**
- **à la présence d'autres micro-organismes tels que des algues, des protozoaires et en particulier des amibes (accès aux nutriments, commensalisme, parasitisme).**
- **à la présence d'un biofilm ou d'un environnement similaire riche en micro-organismes (accès aux nutriments, commensalisme, parasitisme).**

De même dans un ordre croissant, la probabilité d'aérosolisation de *Legionella* infectieuses, à partir d'un réservoir est liée :

- **à l'exposition des bioaérosols à l'oxygène, aux OAF, ou aux UV (la survie étant fonction de la durée et de l'intensité de l'exposition).**
- **à la vitesse de dessiccation des bioaérosols (taux d'humidité de l'air ambiant, nature de la matrice à l'origine de l'aérosol, température de l'air ambiant).**
- **à la taille des aérosols émis (supérieure ou inférieure à 5 µm).**

Le problème des populations exposées est ensuite directement lié au temps de survie du bioaérosol dans l'air. Ce temps conditionne notamment la distance maximale que peut parcourir la forme infectieuse du bioaérosol depuis sa source d'émission. Manifestement des bioaérosols de *Legionella* peuvent infecter une personne située jusqu'à une distance de 3,2 Km du point d'émission (Addiss *et al.*, 1989), des distances proches de 200 m sont également décrites. Ces distances, recueillies à partir de l'étude du contexte d'épidémies de légionellose (EPA, 1999), constituent des éléments d'information mais ne doivent pas être considérées comme des données absolues. Bien sûr les modalités de dissémination des aérosols et les conditions météorologiques sont des facteurs qui contrôlent la portée des bioaérosols infectieux, en particulier les conditions de brouillard, de forts taux d'humidité ou plus généralement de couverture nuageuse, sont favorables au transport de bioaérosols infectieux sur de longues distances (Delery *et al.*, 2003).

V) POINTS A RETENIR

- 1er point : Notions importantes sur les infections à *Legionella*.

Maladies associées : Les légionelles sont essentiellement à l'origine de deux types de maladies, d'une part la légionellose, d'autre part la fièvre de Pontiac. La légionellose ou maladie du légionnaire est une pneumopathie aiguë. Pour l'année 2004, en France, on attribuait de 5 à 15 % des pneumonies communautaires nécessitant une hospitalisation aux bactéries du genre *Legionella*, la létalité associée était évaluée à 14% (BEH, 2004). La fièvre de Pontiac est une maladie non pneumonique de type grippal qui peut se définir comme une forme fébrile d'évolution bénigne.

Seuil d'exposition : Concernant les doses infectieuses, les données collectées chez l'homme sont inexistantes, et les quelques valeurs recueillies sur les modèles animaux ne peuvent être transposées en l'état. Il est donc très difficile à l'heure actuelle d'établir des seuils d'exposition. De plus, la détermination de dose-réponse est également compliquée par le fait qu'il existe des différences importantes de susceptibilité à la maladie entre les individus. De même, la pathogénicité des *Legionella* est clairement liée à l'appartenance à une espèce voire à un séro groupe. Ainsi, en 2003, 99 % des légionelloses diagnostiquées étaient le fait de *L. pneumophila*, plus précisément encore, le séro groupe 1 de *L. pneumophila* regroupait à lui seul 89% de ces légionelloses.

Mode de contamination : Aucune contamination inter-humaine n'a pu être mise en évidence à ce jour. Les animaux ne semblent pas être des réservoirs de la bactérie. La contraction d'une légionellose se fait exclusivement par l'inhalation d'un aérosol bactérien formé à partir d'un réservoir colonisé.

- 2ème point : Réservoirs potentiels, Ecologie et Physiologie des *Legionella*.

Les *Legionella* sont des bactéries ubiquistes à tropisme hydrique dont les concentrations restent cependant relativement faibles dans les milieux environnementaux. Depuis ce réservoir naturel, les légionelles peuvent contaminer des sites artificiels et proliférer dans des proportions importantes si les conditions de température et d'accès aux nutriments sont satisfaites. Dans une moindre mesure, le pH du milieu joue également un rôle.

- Le pH optimal de croissance des *Legionella* serait de 6,9, cependant une gamme de pH comprise entre 5,5 et 8,5 semble tolérée par la bactérie.

- Les conditions de températures favorables aux légionelles sont connues. Les températures favorables à la multiplication sont comprises entre 25 et 45°C, tandis que des températures proches de 35°C semblent optimales.

- En ce qui concerne l'accès aux nutriments, les *Legionella* sont étroitement dépendantes de la flore associée car le métabolisme de nombreux micro-organismes est susceptible de fournir les nutriments qui leur sont indispensables.

- Le parasitisme d'amibes et plus largement de protozoaires est la première voie empruntée par les légionelles pour accéder aux nutriments indispensables. Une autre possibilité est représentée par des relations de commensalisme (notamment avec des algues ou d'autres bactéries). La présence de biofilm favorise l'établissement du parasitisme et du commensalisme et donc favorise le développement des légionelles. Les exigences en nutriments des *Legionella* et leur statut de parasite intra-cellulaire justifient qu'elles semblent incapables de proliférer dans un environnement dépourvu d'hôtes sauf dans certains biofilms complexes.

- Les amibes participent au cycle de vie des légionelles : Elles assurent leur réplication, favorisent leur survie dans l'environnement (résistance aux biocides et aux conditions extrêmes) et pourraient accentuer la virulence vis à vis des macrophages humains.

- 3ème point : Profil des installations à risque.

Deux facteurs prépondérants existent : Le premier étant la probabilité que l'installation renferme un réservoir, le second étant la probabilité que ce réservoir puisse générer des aérosols.

L'existence d'un réservoir dans une installation doit être suspectée si celle-ci renferme une zone humide contenant des matières organiques, se situant à une température élevée (35°C+/-10°C), présentant un pH proche de la neutralité, susceptible d'abriter une flore microbienne variée et nombreuse, notamment sous la forme d'un biofilm. La présence de protozoaires et surtout d'amibes doit être considérée comme un risque supplémentaire.

Si la possibilité d'émission d'aérosol infectieux est avérée, le danger d'une transmission de légionellose est sous l'influence des caractéristiques physico-chimiques de l'atmosphère ambiante, lesquelles déterminent la survie des bioaérosols. Ainsi, les conditions propres à l'air ambiant de chaque site industriel peuvent faciliter ou au contraire réduire la survie des *Legionella* aérosolisées. Par ailleurs, une atmosphère déjà favorable à une sensibilisation allergique des voies respiratoires ou à des manifestations plus chroniques pourrait accroître la sensibilité aux légionelloses.

L'infectiosité des bioaérosols est également fonction de la virulence des souches de *Legionella* présentes. Cette virulence est d'emblée plus forte pour les espèces de *Legionella pneumophila* en particulier pour les *Legionella pneumophila* sérotype 1. *Legionella longbeachae* doit également être considérée comme une espèce à fort pouvoir pathogène.

Dans les risques de transmission de légionellose, la taille des aérosols produit par une source de dissémination est un critère aussi important que la concentration des *Legionella* mises en suspension dans l'air. Le risque de légionellose n'est avéré que pour des bioaérosols dont le diamètre n'excède pas 5 µm.

E. LE DENOMBREMENT DES *LEGIONELLA*

Les trois principales méthodes utilisées pour le dénombrement des *Legionella* sont présentées du point de vue de leur principe général et du niveau d'information qu'elles fournissent.

I) METHODE PAR CULTURE SUR MILIEU GELOSE

PRINCIPE GENERAL :

La méthode par culture est décrite par la norme NF T 90 431 (septembre 2003) complétée par un amendement (A1) paru en avril 2006. Il s'agit d'une méthode basée sur l'ensemencement de milieux gélosés spécifiques et rendus sélectifs par l'ajout d'antibiotiques. Les échantillons sont ensemencés avec et sans concentration préalable. L'étape de concentration est réalisée soit par filtration soit par centrifugation (en fonction de la filtrabilité de l'échantillon à analyser). Des étapes de décontamination thermique et acide (parfois combinées) sont appliquées pour éliminer la flore interférente. Les milieux de culture ensemencés sont incubés pendant une période de 8 à 10 jours. La vitesse de croissance des *Legionella* pouvant être différente en fonction de l'état de stress et en fonction de l'espèce, 3 observations sont réalisées entre le 3ème jour et le dernier jour d'incubation. Ces observations successives permettent une détection précoce des *Legionella*. L'observation visuelle complétée par une observation sous loupe binoculaire permet d'identifier les colonies suspectées d'être des *Legionella*. L'appartenance au genre *Legionella* est confirmée par un test d'exigence à la L-cystéine

pratiqué sur des milieux de culture adaptés. Une étape supplémentaire d'identification basée sur une reconnaissance immunologique (agglutination des bactéries autour de billes de latex greffées à des anticorps anti-*Legionella*) permet la mise en évidence des *Legionella pneumophila* parmi les autres espèces.

NIVEAU D'INFORMATION :

La détection de bactéries sur milieu gélosé implique une capacité de multiplication, les *Legionella* détectées par cette méthode sont donc des *Legionella* cultivables : à partir d'une bactérie déposée sur la gélose se constitue par multiplication un amas de bactéries (ou colonie), d'où la mesure utilisée d'Unité Formant Colonie (UFC). Ce principe présente l'avantage de mettre en évidence des *Legionella* manifestement capables de multiplication, capacité qui traduit une notion de viabilité. En revanche cette méthode s'expose aux inconvénients des cultures sur gélose, à savoir la mise en évidence d'une minorité des bactéries réellement présentes dans un échantillon. En effet, il est reconnu que dans les échantillons les bactéries viables mais non cultivables (VBNC) sont en proportion très majoritaire et que seulement quelques % des bactéries sont cultivables. De plus les milieux utilisés, bien que sélectifs, n'interdisent pas totalement la croissance d'autres bactéries que *Legionella*. La flore dite interférente peut conduire d'une part à l'impossibilité d'observer la présence de *Legionella* (par recouvrement des milieux) et d'autre part peut conduire également à l'inhibition de *Legionella* potentiellement cultivables du fait de la sécrétion de substances inhibitrices.

II) PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) :

PRINCIPE GENERAL :

La norme XP T 90 471 (avril 2006) décrit la mise en œuvre de cette méthode appliquée au dénombrement du génome de *Legionella*. Elle repose sur l'amplification d'une séquence génétique (ou séquence nucléotidique) choisie pour sa spécificité à un genre bactérien ou à une espèce. Chaque copie de cette séquence est destinée à être reproduite au cours d'une polymérisation en chaîne. De plus, chaque reproduction de la séquence génétique ciblée peut à son tour être copiée de sorte que le nombre de copies augmente de façon exponentielle. La reproduction des séquences nucléotidiques est basée sur un mécanisme enzymatique contrôlé par une succession de cycle de température. Les thermocycleurs permettent d'automatiser le processus. De plus plusieurs procédés permettent d'associer un signal fluorescent dont l'intensité augmente au fur et à mesure que le nombre de copies synthétisées augmente. L'interprétation de ce signal fluorescent en particulier l'observation du nombre de cycles nécessaires à son apparition permet de réaliser une quantification du nombre de copies de la séquence génétique initialement présent dans un volume d'échantillon.

NIVEAU D'INFORMATION :

La PCR quantitative permet de dénombrer non pas des cellules mais du matériel génétique, les résultats sont donc exprimés en Unité Génomique par unité de volume. Dans la mesure où les bactéries lysées peuvent relarguer du matériel génétique libre (non intégré au sein d'une cellule) il a été évoqué que les méthodes de PCR quantitatives pouvaient mettre en évidence des bactéries mortes. Les acides nucléiques libérés dans l'environnement sont cependant des substrats nutritifs pour d'autres microorganismes, leur persistance dans les environnements naturels devrait donc être limitée. Par ailleurs les étapes de traitement des échantillons préalables à l'analyses PCR pourraient être susceptibles d'éliminer également ces acides nucléiques libres (notamment pendant les étapes de filtration). Les quantités d'acides nucléiques libres potentiellement détectées par les PCR quantitatives devraient donc être négligeables devant les quantités protégées au sein de bactéries : la mise en évidence par la PCR quantitative de bactéries mortes peut-être contestées.

La méthode est très sensible (détection de faible niveau de contamination), très spécifique (détection ciblée sur le genre *Legionella* ou l'espèce *Legionella pneumophila*) et rapide (obtention de résultats en quelques heures). Elle donne accès aux bactéries qui conservent leur intégrité membranaire. Si un rapprochement doit être fait avec le niveau d'information donnée par la méthode par culture, la PCR donne accès aux bactéries cultivables mais aussi aux bactéries viables mais non cultivables et certainement aux bactéries récemment mortes mais pas encore lysées. La méthode n'apporte donc pas d'information en terme de viabilité. Par ailleurs les traitements appliqués aux échantillons avant la

mise en œuvre de la PCR, destinés à lyser les bactéries, devraient également être efficaces sur d'éventuelles amibes présentes dans l'échantillon et qui pourraient renfermer des *Legionella*.

III) FISH (FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION) :

PRINCIPE GENERAL :

La détection des *Legionella* par la méthode FISH se fait sur l'emploi de sondes complémentaires aux ARN (Acides Ribonucléiques). Des séquences nucléotidiques associées à des marqueurs fluorescents s'introduisent dans les cellules bactériennes et s'hybrident aux ARN sous réserve que les séquences soient complémentaires, c'est à dire sous réserve que la bactérie appartienne bien au genre ou à l'espèce recherchée. Le dénombrement réalisé par microscopie intervient généralement après filtration de l'échantillon et se fait donc sur la base du nombre de bactéries fluorescentes. La présence en grande quantité des ARN dans les cellules permet d'obtenir des signaux fluorescents facilement exploitables sur la base d'un mécanisme d'amplification naturel. Pour le moment la méthode s'applique à des échantillons peu chargés et nécessite des compétences appropriées.

NIVEAU D'INFORMATION :

La méthode est très spécifique et très sensible. Outil de détection rapide (quelques heures) celui-ci donne accès aux formes cultivables et non cultivables de la bactérie ; le dénombrement est exprimé en bactéries par unité de volume. Le signal fluorescent étant associé à la présence en grand nombre d'ARN, molécule dont la durée de vie au sein des cellules est courte, cette méthode met préférentiellement en évidence les bactéries qui présentent une forte activité métabolique ; cette activité est extrapolée par certains à la viabilité des cellules. Seule les bactéries intègres sont visibles.

IV) CONCLUSION

Les méthodes de dénombrement sont en évolution et s'orientent vers les outils de biologie moléculaire. Il n'existe actuellement pas de méthode facile à mettre en œuvre qui permettrait une détection spécifique des *Legionella* uniquement viables (seule information réellement pertinente pour l'appréciation des niveaux d'exposition). Les deux méthodes faisant actuellement l'objet d'une norme sont la méthode de culture sur milieu gélosé et la méthode de PCR quantitative. A l'une des extrémités se trouve la méthode de détection par culture pour laquelle des seuils réglementaires sont disponibles mais uniquement sur les matrices les mieux connues. Cette méthode, focalisée sur les bactéries cultivables, sous-estime *a priori* largement le nombre de *Legionella*. A l'autre extrémité, la PCR quantitative met en évidence le plus grand nombre de *Legionella* mais uniquement sur la base de la présence d'unité génome dont l'interprétation en terme de risque sanitaire n'est pas usuelle. D'autres méthodologies alternatives comme la cytométrie en flux ou la cytométrie en phase solide sont en développement et apporteront peut-être des solutions en permettant par exemple le dénombrement de cellules de *Legionella* dont la viabilité sera testée par un marqueur spécifique.

F. ANALYSE D'UN EXEMPLE DE CONTAMINATION DE SITE INDUSTRIEL. (Bretin *et al.*, 2004 ; BEH, 2004 ; Nguyen *et al.*, 2006)

Au début du mois de novembre 2003 et pendant une période de deux mois et demi, la région lensoise a connu la plus importante épidémie de légionellose constatée en France. L'alerte a été donnée le 28 novembre 2003 alors que sur la commune de Harnes (14 000 habitants), en cinq jours, deux cas communautaires ont été déclarés à la DDASS locale. Le nombre de cas de légionellose devait alors augmenter rapidement pour atteindre 52 au 31 décembre 2003 et finalement 86 au terme de l'épidémie. Parmi les malades répertoriés entre le 5 novembre 2003 et le 22 janvier 2004, 84 seront

hospitalisés et 18 décès seront finalement recensés. Plus précisément, 26 cas ont été observés entre le 5 novembre et le 9 décembre, tandis que 60 ont été répertoriés entre le 11 décembre et le 22 janvier.

Etant donné l'ampleur de cette épidémie il semble intéressant de mettre à profit les données recueillies afin de les confronter avec celles de la bibliographie. **Les cas groupés de légionellose de la région lensoise, pourraient permettre de souligner des pratiques à risque sur un site industriel. De plus, les données recueillies sont certainement à confronter à celles disponibles dans la littérature soit pour les corriger soit pour les conforter ou les compléter.**

I) LES DONNEES TERRAINS CONFRONTEES AUX DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.

Les principaux paramètres qui influencent la survenue de cas groupés de légionellose sont analysés afin de confirmer leur cohérence avec les données bibliographiques. Par ailleurs les informations susceptibles de compléter l'étude bibliographique précédente sont également fournies.

I-1) PATHOGENECITE DES ESPECES DE *LEGIONELLA SPP.*

En accord avec les observations de répartition des souches de *Legionella* classiquement impliquées dans les légionelloses, la souche épidémique lensoise était une ***Legionella pneumophila* de sérotype 1**. Celle-ci n'avait pas encore été répertoriée parmi les 2 000 génotypes recensés dans la souchothèque du centre de référence français (CNRL). Cette nouvelle souche a été identifiée sous l'intitulé **Lp-1 Lens**.

I-2) PROFIL DES MALADES : ADEQUATION AVEC LES FACTEURS DE RISQUE REPERTORIES.

Les personnes atteintes correspondaient effectivement aux populations classiquement décrites à risque pour les légionelloses à savoir des individus âgés (âge médian des malades : 75,5 ans) et plutôt de sexe masculin (Sexe ratio Homme/Femme de 1,5). Des facteurs aggravants ont également été soulignés comme la silicose, le tabagisme. A noter que les individus ayant passé plus de 100 min par jour à l'extérieur ont semblé plus atteints.

I-3) DIVERSITES DES EQUIPEMENTS SUSCEPTIBLES D'HEBERGER UN RESERVOIR DE *LEGIONELLA* ?

Le nombre de cas, la durée de l'épidémie, les contaminations d'individus éloignés des foyers supposés de dissémination ont amené à envisager un certain nombre d'équipements comme des réservoirs possibles de *Legionella*. Des installations peu souvent citées dans les études épidémiologiques ont alors été proposées. Ainsi, en dehors des tours aéroréfrigérantes, du réseau public d'eau potable, des jets d'eaux et des fontaines décoratives, ont également été mentionnés divers systèmes de climatisation/réfrigération, les stations de lavage de voitures, les eaux provenant de forages privés ou industriels, les stations d'épuration, les engins de nettoyage des réseaux d'assainissement et des voiries et enfin les eaux des canaux. En l'occurrence, plusieurs sources citées par les experts ont confirmé leur potentiel à abriter une souche de *Legionella* pathogène. La souche épidémique a en effet été mise en évidence en petite quantité dans une station de lavage de voiture et dans une tour aéroréfrigérante d'un circuit industriel. De plus, elle a également été trouvée en très forte concentration sur plusieurs équipements du site industriel pétrochimique de Noroxo, en particulier dans les TARs des circuits de refroidissement et dans le bassin d'une lagune destinée au traitement des effluents du site. Le tableau 5 présente les catégories d'échantillons qui ont fait l'objet d'analyses pendant la période d'investigation liée à l'épidémie.

Tableau 5 : Cas groupés de légionellose de Harnes, répartition (n analysés versus n positifs) en fonction des catégories d'échantillons.

Catégories d'échantillons analysés	N analysés	N positifs (<i>Legionella cultivables</i>)
Echantillons environnementaux DONT	> 1100	104
Tours aérorefrigérantes	610	44
Stations d'épuration	97	43
Origine domestique	68	6
Stations de lavage de voitures *	165	5
Circuits industriels de refroidissement *	41	2
Divers	30	2
Echantillons d'air prélevés sur le site industriel contaminé	12	2
Equipements municipaux mobiles	36	0
Forages et canaux	26	0
Systèmes de climatisation d'immeubles	10	0
Fontaines décoratives	6	0

* Types d'échantillons ayant présenté la souche épidémique

A la lecture du tableau 5, il apparaît que des *Legionella* ont été retrouvées dans un certain nombre de TARs mais aussi dans une certaine proportion des stations d'épuration.

I-4) TRANSFERT DE CONTAMINATION DEPUIS UN FOYER INITIAL VERS DES FOYERS SECONDAIRES !

Le profil de l'épidémie de Harnes pose également le problème de la diversité des sources potentielles de bioaérosols infectieux à partir d'un même site, préalablement identifié comme réservoir.

Le déroulement de l'épidémie de Harnes a été particulier puisque deux vagues de contamination ont été observées : Une, avant la période d'arrêt des TARs de l'usine Noroxo et l'autre après. Malgré l'arrêt de la source majeure de contamination, des cas de légionellose sont apparus au-delà de la période d'incubation classique. Aussi, la persistance de l'épidémie à amener les experts à considérer qu'en dehors du seul panache des TARs, la présence d'autres sources d'aérosols infectieux sur le site Noroxo était probable : **Le site en lui-même, et non plus seulement les TARs, est apparu comme une source persistante et intermittente de bioaérosols infectieux.** Les activités annexes réalisées sur le site comme le nettoyage de pièces industrielles ou de camions, le traitement des effluents par lagunage, ont été évoquées comme sources ponctuelles de dissémination d'aérosols conduisant à une contamination plus ou moins globale du site.

Si les TARs du site de Noroxo semblent bien constituer un des foyers importants de dissémination des *Legionella* épidémiques, leur contamination ne s'est manifestement pas réalisée par l'apport d'eau de forage utilisée comme eau d'appoint. **Une contamination par voie aérienne semble plus probable** soit par le système d'aération de la lagune, soit par les opérations de lavage des camions citernes (opération systématiquement réalisée à 300 m des TARs), soit du fait du dégazage des camions citernes réalisé au cours des phases de pompage des boues de divers bassins notamment ceux des TARs, soit encore par le nettoyage de filtre presse (utilisé pour l'assèchement des boues), soit enfin

pendant les opérations de dépotage des boues d'ensemencement en provenance de l'usine de chimie fine.

La mission d'étude évoque également dans son rapport la possibilité d'une extension progressive du nombre de foyers de contamination à partir d'une aérocontamination par le foyer initial. Il est ainsi intéressant de noter la **capacité manifeste d'un transfert de contamination depuis un site initial vers des sites secondaires voisins**. L'hypothèse d'une extension progressive des zones contaminées par la souche épidémique, laisse présager du potentiel de survie des *Legionella* dans des aérosols puisque seule des bactéries capables de multiplication pourraient investir un nouveau site. En effet, tout comme pour une contamination d'individu, l'aérocontamination d'un nouveau foyer à partir d'un ancien nécessite que les *Legionella* transportées par les aérosols survivent et conservent un potentiel de multiplication !

A l'échelle d'un site industriel, du fait de la « mobilité » des *Legionella* par bioaérosols, la présence d'un réservoir ponctuel dans une étape de la filière doit impliquer une gestion globale du risque légionelle sur l'ensemble du site.

I-5) SURVIE ET PERSISTANCE DE L'INFECTIOSITE DES *LEGIONELLA* DANS DES BIOAEROSOLS ?

L'épidémie lensoise, se déroulant dans un cadre hivernal, la température moyenne de l'air pendant l'épidémie était de 5°C et l'humidité relative moyenne de 90%. **Dans ce contexte, il semble que l'un des malades est pu contracter la maladie sans s'être jamais approché à moins de 12 km des principaux foyers connus de contamination. Avec presque 4 fois la distance considérée jusqu'alors comme maximale pour une contamination aéroportée de légionellose (3,2 km – Addiss *et al.*, 1989), il s'agit de loin de la distance la plus importante décrite...**

Une analyse plus fine doit être réalisée pour mieux évaluer la distance critique pour laquelle le plus grand nombre de cas a été observé. Tous les cas de légionellose décrits habitaient ou avaient fréquenté une zone délimitée par un rayon de 12 km autour de la commune de Harnes, dans les 10 jours précédents le début des symptômes. Cependant en dehors du cas de contamination à longue portée (certainement très particulier) l'épidémie s'est concentrée dans un cercle relativement restreint. En effet, 48 des 86 cas (soit plus de 53%) résidaient ou s'étaient rendu à Harnes ou dans l'une des 4 communes limitrophes. Par ailleurs, alors que dans la zone de 12 km de rayon, le taux d'attaque était de 3,9 cas pour 10 000 habitants, sur la commune de Harnes ce même taux s'élevé à 16,7 cas pour 10 000 habitants (soit une multiplication par plus de 4 du taux d'attaque). **Il semble que la proximité immédiate du foyer de dissémination ait accrue considérablement les risques de contamination.** Comme le montre le tableau 6, un éloignement légèrement plus important a impliqué une rapide diminution du taux d'attaque.

Tableau 6 : Cas groupés de légionellose de Harnes, taux d'attaque observés en fonction de la distance au foyer de contamination.

	ZONE 1: Harnes et communes limitrophes		ZONE 2 :	ZONE 3 :
	Harnes	3 communes limitrophes	zone délimitée par un rayon de 6 km autour de Harnes	zone délimitée par un rayon de 12 km autour de Harnes
Nombre de communes concernées	4		15	22
Nombre de cas recensés	40 (47%)		70 (81%)	83 (97%)
Taux d'attaque de la zone concernée /10 000 habitants	16,7	5 à 7	ND	3,9

L'observation des taux d'attaque de l'épidémie semble indiquer que les risques importants de légionellose sont avérés surtout lorsque des personnes à risque séjournent à une faible distance de la source d'émission des bioaérosols infectieux. Sachant que 81% des cas se sont concentrés sur une zone géographique située à moins de 6 km de Harnes, sachant également que parmi les patients chez lesquels il a été possible de mettre en évidence la souche épidémique l'un ne s'est pas approché à moins de 7 km du foyer de contamination présumé, il semble que, **concernant l'épidémie lensoise, la distance critique à retenir soit de 6 à 7 km.**

Du point de vue des populations riveraines d'une source de dissémination d'aérosols, l'exposition à des bioaérosols infectieux peut être envisagée pour des distances de l'ordre du kilomètre.

I-6) METHODOLOGIES DE DENOMBREMENT DE *LEGIONELLA* CULTIVABLES OU DE GENOME DE *LEGIONELLA* A PARTIR D'AEROSOLS.

Une démarche innovante de l'enquête a été de rechercher des *Legionella* dans les aérosols. En l'absence de technique de référence, une méthode expérimentale de mesure de concentration des *Legionella* dans l'air, mise au point par le centre scientifique et technique du bâtiment (CSTB), a été utilisée pour évaluer la dissémination de *Legionella* par la lagune de l'entreprise Noroxo. Un préleveur de type « cyclone » a été utilisé. Ainsi, des prélèvements atmosphériques réalisés à proximité de la lagune, alors que ses aérateurs fonctionnaient et que les TARs de l'usine étaient au contraire à l'arrêt, ont conduit à la détection de *Legionella* cultivables à hauteur de 330 UFC/m³ d'air pour les prélèvements réalisés à 270 m de la lagune et à hauteur de 5 400 UFC/m³ pour l'air collecté à proximité immédiate.

Outre le fait que la présence de *Legionella* cultivables confirme la survie de la bactérie dans les bioaérosols, il doit être retenu que des outils analytiques adaptés à la recherche de *Legionella* dans des bioaérosols existent.

II) CONCLUSIONS SUR L'ORIGINE DE LA CONTAMINATION

Au terme des investigations, la souche épidémique a été retrouvée sur le site industriel de Noroxo à différents niveaux : TARs, Lagune, Eaux issues du décanteur, Entrée du bassin de confinement, Boues d'ensemencement de la lagune. L'historique du site a montré que les TARs avaient présenté des contaminations récurrentes de niveaux élevées depuis une longue période avant le début de l'épidémie. Ainsi, des concentrations supérieures à 1 000 000 UFC/l avaient été mises en évidence dans les TARs des circuits de refroidissement, plus précisément 730 000 UFC/l et 600 000 UFC/l étaient dénombrées respectivement le 15 octobre et le 20 novembre 2003. Par ailleurs de très fortes concentrations ont aussi été mises en évidence dans plusieurs bassins du circuit de collecte des eaux usées de l'entreprise et en particulier dans la lagune aérée pour laquelle une concentration de 2,1.10⁸ UFC/l a été mesurée.

Il a été fait l'hypothèse que le site de Noroxo renfermait 2 foyers principaux et distincts de bioaérosols infectieux : d'une part les circuits de refroidissement dits « évaporatifs » (tours aérorefrigérantes) et d'autre part le système de traitement des effluents de l'usine. **Si la contamination de TARs par des *Legionella* est connue, celle d'une lagune apparaît comme un élément nouveau** : Constitué d'une lagune équipée d'aérateurs, le système de traitement des effluents créait en surface une émulsion susceptible de générer des aérosols. Classiquement le maintien de l'efficacité d'une telle lagune entraîne un ré-ensemencement périodique. En l'occurrence la lagune de Noroxo était ré-ensemencée par des boues d'une STEP d'une société spécialisée dans la chimie fine. Des analyses pratiquées sur celle-ci ont montré la présence de *Legionella* à des quantités extrêmement importantes (de l'ordre de 10¹⁰ UFC/l) avec présence de la souche épidémique.

Au total, cinq foyers ont été recensés sur le site de Noroxo. Ils ont pu se succéder ou se cumuler au fil de l'épidémie. Ainsi, la première vague d'épidémie serait principalement due à l'activité des TARs (panache). La seconde vague d'épidémie serait à attribuer à plusieurs sources ponctuelles. Parmi ces diverses sources sont citées, le nettoyage des TARs avec des jets « haute pression » (pour partie réalisé au sommet des installations), le nettoyage des camions apportant des boues pour le ré-ensemencement périodique de la lagune, et de nouveau les TARs après redémarrage. Enfin sur la

totalité de l'épidémie, la lagune elle-même apparaît comme une source diffuse. Le tableau 7 permet de mettre en évidence les différentes voies d'exposition supposées.

Tableau 7 : Cas groupés de légionellose de Harnes, sources potentielles d'aérosols infectieux et rôle envisagé dans l'épidémie.

Sources potentielles d'aérosols infectieux	Conditions spécifiques associées à la création d'aérosols	Rôle joué dans l'épidémie	
		Première vague	Seconde vague
TARs de l'usine NOROXO	Panache	X (avant arrêt)	X (après redémarrage)
	Nettoyage en hauteur des éléments contaminés	/	X
Lagune	Aération	X	X
	Nettoyage	X	X
Camions de transport des boues	Dégazage	X	X
	Dépotage	X	X

III) POINTS A RETENIR

- 1^{er} point : un profil de cas groupés classique

Les cas groupés de la région lensoise confirme la prédominance de ***Legionella pneumophila* séro-groupe 1 parmi les *Legionella* les plus virulentes**. Cette virulence s'est exprimée essentiellement chez des individus fragilisés et non pas à l'ensemble des personnes exposées.

- 2^{ème} point : des réservoirs et des sources de dissémination de bioaérosols inédites !

L'implication de tours aéroréfrigérantes est fortement suspectée, mais d'autres sources moins bien connues sont évoquées. Ainsi concernant les réservoirs et sources d'aérosols plusieurs enseignements ont été apportés :

Du point de vue des déchets, la **présence de *Legionella* dans des boues de STEP industrielles** a été montrée. De plus, le transport et les mouvements de boues pourraient générer des bioaérosols.

Du point de vue des installations de traitement des déchets,

- pendant les investigations, des *Legionella* ont été mise en évidence dans un certain nombre de **STEP**.

- des *Legionella* ont été mise en évidence dans un **bassin de lagunage industriel**. Les quantités qui ont été observées étaient importantes. Les bioaérosols, consécutifs au fonctionnement d'aérateurs de surface et collectés jusqu'à 300 m de la lagune ont montré la présence de *Legionella*.

Aussi bien pour les boues de la STEP industrielle que pour le bassin de lagunage, les quantités qui ont été observées étaient importantes. La souche épidémique faisait partie des *Legionella* présentes.

- 3^{ème} point : survie des *Legionella* dans les bioaérosols.

Deux éléments supportent le fait que des *Legionella* transportées par bioaérosols peuvent survivre et se multiplier ultérieurement une fois déposées en milieu favorable :

- la souche épidémique de *Legionella* pourrait avoir contaminé d'abord l'ensemble d'un site industriel puis des sites voisins par le biais de bioaérosols.

- des *Legionella* cultivables sur milieu gélosé ont été obtenues à partir des bioaérosols collectés à proximité de la lagune.

- 4^{ème} point : Distances de dissémination de bioaérosols potentiellement infectieux

Dans un contexte favorable (aérolitique, faible température de l'air ambiant, forte hygrométrie, ...) des contaminations exceptionnelles à longue distance (12 km) pourraient avoir lieu.

La distance « critique » observée dans le contexte de Harnes est de 6 à 7 km et dépasse la distance maximale classiquement retenue jusqu'à présent d'environ 3 km.

Les bioaérosols infectieux peuvent être transportés sur des distances de l'ordre du kilomètre

G. DECHETS ET LEGIONELLES

La classification des déchets peut être réalisée suivant de nombreux critères. Une approche intéressante et de distinguer les déchets en fonction de leur nature et des traitements qui leur sont appliqués.

Damien (2004) recense dans son ouvrage, 22 types de déchets (Cf. tableau 8). Ce classement présente l'avantage de rassembler les déchets en familles dont les principales caractéristiques sont communes (matière organique naturelle ou synthétique, déchets traités ou non, ...). Il est alors aisé de recenser les familles de résidus les plus susceptibles d'abriter des micro-organismes pathogènes et notamment des bactéries du genre *Legionella*. La contamination des filières déchets « à la source » peut dès lors être discutée. En revanche, ce type de démarche ne reflète pas la réalité des filières de traitement au cours desquelles, certaines familles de déchets sont associées en proportions variables. (ex : Collecte de déchets et opérations de tri, incinération, ...). Aussi, dans un premier temps, la probabilité de la présence des *Legionella* dans les différentes familles de déchets sera abordée, puis la réflexion sera étendue aux différentes filières de traitement. Afin de compléter le recensement des types de déchets réalisé par Damien (2004), le cas des ordures ménagères sera également abordé.

I) PROBABILITES DE PRESENCE ET DE PROLIFERATION DES *LEGIONELLA* EN FONCTION DE LA NATURE DES DECHETS

Parmi les 22 catégories de déchets recensées par Damien (2004) (Cf. tableau 8) Les déchets hospitaliers, l'ensemble bois non-traités et matières organiques naturelles et en dernier point les boues ont retenu notre attention. Le cas des déchets ménagers, est également traité au préalable.

I-1) LES DECHETS MENAGERS ET ASSIMILES

Les déchets ménagers et assimilés sont produits par les ménages. Ils comprennent également les déchets dits "occasionnels" tels que les encombrants, des déchets verts et les déchets de bricolage. L'ensemble des déchets industriels banals issus de l'activité des artisans, des commerçants et qui sont collectés avec les déchets des ménages sont également inclus.

Lors des phases de ramassage mais surtout de stockage, les microorganismes sont susceptibles de proliférer. Delery en 2003 s'appuie sur des travaux précédents pour synthétiser les données relatives aux bactéries pathogènes déjà mises en évidence dans les ordures ménagères fraîches. Parmi celles-ci *Legionella pneumophila* est citée mais les quantités associées ne sont pas précisées. La présence de *Legionella* dans les ordures ménagères ne semble pas être décrite dans d'autres travaux.

I-2) LES DECHETS HOSPITALIERS

I-2-1) Contenu.

Les déchets hospitaliers abritent pour partie des déchets contaminés (déchets anatomiques, déchets souillés par des germes pathogènes, liquides, déchets d'autopsie). Plus généralement, les déchets d'activités de soins sont constitués par les déchets issus des activités de diagnostic, de suivi et de traitement préventif, curatif ou palliatif dans les domaines de la médecine humaine ou vétérinaire (code de la santé publique, article R 1335-1). Parmi ces déchets, ceux qui présentent un risque infectieux sont nommés DASRI (Déchets d'Activités de Soins à Risques Infectieux) et doivent suivre une filière d'élimination spécifique (incinération ou désinfection).

La contamination de ces déchets par des *Legionella* ne peut être exclue, d'autant plus que les maladies nosocomiales intègrent la légionellose.

I-2-2) Conditions de traitement.

Le traitement des déchets hospitaliers est spécifique (David 2004) : Ces derniers ne peuvent être mélangés aux déchets ménagers. Du personnel habilité les conditionne dans des emballages hermétiques eux-mêmes placés dans des conteneurs étanches utilisés pour le transfert vers le centre de traitement. Ils sont ensuite incinérés sans ou avec décontamination préalable. Ainsi le traitement des déchets d'activités de soins est autorisé dans trois types d'installations :

- les usines d'incinération d'ordures ménagères (UIOM) dans la limite d'une proportion définie en fonction de la capacité totale de traitement de l'installation concernée.
- les incinérateurs spécifiques (réglementation des installations classées) implantés sur le site de production des DASRI ou à l'extérieur.
- les appareils de désinfection (agrés par les ministères compétents), qui permettent que les déchets traités puissent regagner une filière de traitement des ordures ménagères à l'exclusion du compostage. Il s'agit des procédés de banalisation.

□ Cas des déchets non décontaminés

Les manipulations humaines et le passage en fosse sont clairement proscrits. Les conteneurs de déchets contaminés sont transportés et vidés au niveau de la trémie par un convoyeur aérien automatisé. Pour éviter toute dissémination d'agents microbiologiques pathogènes au niveau des installations de l'incinérateur (grappin, fosse, ...), les déchets sont directement introduits dans les trémies des fours d'incinération. Les DASRI et assimilés sont incinérés dans les 48 h au plus tard après leur arrivée au centre d'incinération.

□ Cas des déchets décontaminés

La banalisation consiste en une désinfection associée à une modification de l'apparence des DASRI, c'est-à-dire à un broyage ou à un compactage. Différentes techniques peuvent être utilisées pour désinfecter les DASRI : micro-ondes, ajout de produits chimiques désinfectants, ozone ou encore hautes températures associées à des pressions élevées (3 ou 4 bars). Suivant les marques et les modèles, un broyage ou un compactage est associé à la désinfection. Le broyage peut avoir lieu avant ou après la désinfection (INRS, 2007). En terme de capacité de traitement, ces machines

peuvent être adaptées pour gérer toute la production d'un centre hospitalier, ou dimensionnées pour être installées à l'intérieur d'un service producteur.

En terme d'efficacité de traitement, seuls les banaliseurs validés par le conseil publique d'hygiène de France peuvent être utilisés. Les techniques utilisées permettent de désinfecter efficacement les déchets traités.

Après décontamination, les déchets hospitaliers et plus généralement les DASRI peuvent être traités comme des déchets assimilables aux déchets ménagers (passage en fosse), cependant ils ne devront pas rejoindre les filières de compostage. Leur enfouissement en centre technique reste possible.

Tableau 8 : Familles de déchets regroupées par type de traitement (Damien, 2004)

Les ferrailles	Les déchets hospitaliers et les médicaments
Les métaux non ferreux	Les déchets textiles
Les véhicules hors d'usage (VHU)	Les solvants et les peintures usagées
Les piles et les accumulateurs	Les bois non traités et les matières organiques naturelles
Les pneus usagés (PU)	Le verre
Les bois traités et les palettes	Les emballages
Les papiers-cartons	L'amiante
Les matières plastiques	Les farines animales
Les huiles usagées	Les déchets d'équipement électriques et électroniques (DEEE)
Les PCB et PCT	Les boues
Les déchets du bâtiment et des travaux publics	Les tubes fluorescents et les lampes à vapeur de mercure

I-2-3) Relations avec les *Legionella*.

Le principal risque associé aux déchets hospitaliers est celui entraîné par la contamination initiale des déchets. En effet, une exposition ponctuelle du personnel du centre ou une extension de la contamination aux autres déchets sont possibles. Par ailleurs, l'origine hospitalière des souches de *Legionella* doit être considérée car elle implique la présence de souches virulentes.

Les conditions spécifiques de traitement sont cependant bien adaptées. L'incinération directe ou le passage en fosse, qui n'est autorisé que dans la mesure où une décontamination a été préalablement

réalisée, limitent aussi bien l'exposition des personnels, que les possibilités d'extension de la contamination à l'ensemble de l'installation ou aux autres déchets. Dans ces conditions, **il semble que le broyage réalisé en amont des étapes de décontamination soit la principale étape à risque**, notamment pendant la phase de déconditionnement des déchets et celle de fonctionnement du broyeur. Des bioaérosols infectieux sont alors susceptibles d'être dispersés.

Il n'existe manifestement pas de données sur la fréquence ou les niveaux de contamination des déchets hospitaliers par les bactéries du genre *Legionella*. Bien que des contaminations ponctuelles soient probables (déchets issus de patients infectés), **selon toute vraisemblance, cette matrice ne semble pas représenter un réservoir important.**

I-3) LE BOIS NON TRAITE ET LES MATIERES ORGANIQUES NATURELLES

Cet ensemble, constitué par les bois d'emballage non traités et les déchets verts (résidus de tonte, résidus de taille de haie, d'arbustes et d'élagage), peut héberger des micro-organismes en nombre important notamment si des périodes de stockage sont observées (avant ou après collecte). **Aucune étude ne permet pour l'heure de trancher sur l'absence ou la présence de *Legionella* dans ces matrices, cependant les conditions d'une colonisation par la bactérie ne semblent pas réunies.** Les phases de stockage, classiquement réalisées à l'abri des intempéries, se déroulent en l'absence d'apport d'eau et ne paraissent donc pas favorables aux *Legionella*.

Cette catégorie de déchets n'est vraisemblablement pas une source potentielle de contamination des installations de traitement de déchets susceptibles de les accueillir (usines d'incinération et centres de compostage).

I-4) LES BOUES

Un habitant produit de 150 à 200 litres d'eau usée par jour. Ceci conduit à une production de 70 à 90 g de matières en suspension (matières non dissoutes), 60 à 70 g de matières organiques (DBO₅), 15 à 17 g de matières azotées (azote total), 4 g de phosphore et des micro-organismes par milliard pour chaque litre d'eau usée (Damien, 2004).

I-4-1) Contenu.

Sous cette catégorie, on considère principalement les boues de station d'épuration. Les boues sont particulièrement riches en matières organiques. Elles abritent une diversité et une quantité de micro-organismes très importantes. Les quantités en eau peuvent être très variables suivant les procédés employés et la nature de la boue considérée : boue activée dans les bassins de STEP, boue évacuée de la STEP (plus ou moins séchée et hygiénisée). Les boues peuvent donc se présenter sous des aspects très différents, depuis l'état liquide jusqu'à l'état solide, motté ou pulvérulent. Les différentes catégories de boues sont présentées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Les différentes catégories de boues, siccités et procédés utilisés (Damien, 2004)

Dénominations usuelles	Siccité (%)	Procédés utilisés
Boue liquide	3	Epaississeur statique ou hersé
Boue liquide égouttée	6	Tables d'égouttage
Boue pâteuse	18	Epaississement et filtres à bandes
Boue pâteuse chaulée	25	Epaississement, filtres à bandes et chaulage
Boue solide chaulée	35	Epaississement, filtre presse avec conditionnement à la chaux et au chlorure ferrique
Boue solide digérée et chaulée	35	Epaississement, digestion, centrifugeuse, chaulage éventuel
Boue sèche	95	Epaississement, digestion, centrifugeuse, séchage thermique

I-4-2) Conditions de traitement.

A l'horizon 2005, on attendait 1 300 000 t/an de MS en France. Dans les différentes filières d'accueil, comme les unités de compostage, les unités de co-incinération et d'incinération ainsi que les centres d'enfouissement technique, le mélange aux autres déchets est pratiqué. La valorisation des boues passe par l'épandage (agricole ou non).

□ Cas de l'épandage

Les boues sont épandues sur sols agricoles, sols forestiers ou sur les zones de re-végétalisation, par les exploitants eux-mêmes. Dans les cas de valorisation agricole, une incorporation au sol est réalisée après épandage.

□ Cas des autres filières de traitement

Dans les centres d'enfouissement technique, les unités de compostage ou d'incinération, les boues sont généralement mélangées aux autres déchets et suivent donc les procédés classiques de la filière. Des particularités existent cependant, notamment au niveau des unités d'incinération dans lesquels le mélange aux autres déchets n'est pas systématique. En effet certains incinérateurs ne traitent que des boues, tandis que d'autres les pulvérisent au-dessus du foyer.

I-4-3) Relations avec les légionelles.

Plusieurs éléments de la bibliographie sont favorables à l'hypothèse que les boues de STEP puissent être un réservoir de la bactérie *Legionella*.

Par exemple, une étude de Stampi *et al.*, 2000 dénombrent 3 % d'échantillons permettant la culture de *Legionella* parmi 241 échantillons d'effluents de STEP collectés. Gregersen *et al.*, (1999) évoquent la contamination du personnel d'une STEP d'industrie agroalimentaire (5 intervenants) probablement par les boues du décanteur de la station dans laquelle a été mis en évidence une quantité de $1,5 \cdot 10^7$ UFC de *L. p. sg* 1 par gramme de boue. Enfin, notons également, l'importante contamination d'une lagune industrielle (Noroxo) via l'apport de boues de STEP d'une industrie de chimie fine (Bretin *et al.*, 2004).

Les boues fraîches pourraient donc abriter des quantités importantes de *Legionella*, il n'existe cependant pas ou peu de données sur les concentrations dans cette matrice. De plus, les données disponibles manquent pour évaluer le potentiel de survie des *Legionella* au fur et à mesure de

l'évolution des conditions physico-chimiques des boues et notamment au fur et à mesure des pertes en eau et des traitements d'hygiénisation. De même, les temps de stockage et de transport plus ou moins longs modifient certainement les quantités et l'état physiologique des *Legionella*. Il semble probable que le maintien d'un pourcentage élevé d'humidité favorisera la survie des *Legionella*.

Dans l'hypothèse que des boues liquides ou relativement humides renfermeraient des *Legionella* en quantité importante, plusieurs conséquences pourraient être envisagées :

- **les aérosols dispersés par les bassins aérés des STEP ou des lagunes renfermant des boues contaminées sont potentiellement des vecteurs de *Legionella* infectieuses.**
- **l'épandage des boues et plus généralement toutes les étapes d'aspiration ou de déchargement pourraient être à risque pour les personnels impliqués (aérosols générés pendant les phases de transport, pendant l'épandage et l'enfouissement consécutif).**
- **l'exportation de la contamination aux installations de traitement des déchets recevant ces boues :**
 - zones de stockage (multiplication et constitution d'un réservoir important).
 - zones de pré-traitement (étapes de mélange ou de broyage – dispersion d'aérosols).
 - installations périphériques telles que circuits de refroidissement ou unités de traitement des fumées, ... (extension de la contamination aux circuits d'eau du centre de traitement – cf. partie F - Bretin *et al.*, 2004).

I-5) CONCLUSION

En première analyse, les boues de STEP constituent le déchet entrant le plus à risque. Largement représentées dans les différentes filières de traitement, les boues, de part leur fonction d'épuration des eaux domestiques ou industrielles, sont chargées en polluants et en micro-organismes. La multiplicité des états rencontrés, la diversité des procédés mis en jeu pour leur valorisation/traitement, et leur contenu en polluants ou en micro-organismes pathogènes (notamment en *Legionella*) en font un déchet plus sensible que les déchets hospitaliers ou les matières organiques.

En dehors du cas particulier des déchets hospitaliers, monofilière (incinération) et non mélangés, il semble plus judicieux d'aborder le problème de la contamination des déchets par les légionelles à partir des filières de traitement considérées dans leur ensemble.

II) PROBABILITES DE PRESENCE ET DE PROLIFERATION DES *LEGIONELLA* EN FONCTION DES FILIERES DE TRAITEMENT DES DECHETS.

Diverses filières de traitement des déchets existent et pour les différentes installations d'une même filière, les procédés mis en œuvre sont globalement identiques mais peuvent légèrement varier en fonction des spécificités propres à chaque site. Les procédés sont étudiés à partir d'une approche globale destinée à déterminer les points vraisemblablement les plus critiques vis à vis d'une problématique bien définie : les risques encourus par le personnel des centres de déchets et par les populations voisines, de contracter une légionellose du fait de l'activité des installations.

Les différentes unités de traitement abordées sont : l'incinération et la co-incinération, les procédés thermiques de dégradation des déchets (pyrolyse), et les procédés biologiques de traitement des déchets (STEP et compostage). L'ouvrage de Damien, 2004 a apporté beaucoup des informations concernant les procédés industriels décrits dans les paragraphes suivants.

II-1) L'INCINERATION

L'incinération est une combustion réalisée en excès d'air. Elle s'applique aux déchets solides ou liquides.

II-1-1) Description succincte :

Classiquement, les déchets solides sont stockés dans une fosse depuis laquelle un grappin assure l'homogénéisation et le déversement progressif dans la trémie de l'incinérateur. Différentes fosses peuvent co-exister au sein de l'installation. Par exemple, un site peut présenter une fosse qui réceptionne les déchets entrants, puis une seconde qui collecte les déchets broyés et une dernière dans laquelle sont stockés et homogénéisés les déchets avant incinération.

La combustion réalisée en excès d'air à des températures supérieures à 850°C, dégage des résidus d'incinération (mâchefers) et des fumées dont la chaleur est exploitée (système de récupération). Les fumées refroidies sont lavées de leurs polluants, puis filtrées pour recueillir les cendres également chargées de polluants. Ces dernières en tant que déchets ultimes, seront expédiées vers les centres d'enfouissement technique.

II-2-1) Analyse de l'installation :

L'incinération est sans doute la filière susceptible d'accueillir la plus grande diversité de déchets. Si les fours semblent, étant donné les températures qui y règnent, des installations incapables de disséminer des bioaérosols de *Legionella* infectieux, en revanche les usines d'incinération considérées dans leur ensemble demeurent des installations à risque non nul. La figure 3 présente les différentes étapes de ces installations :

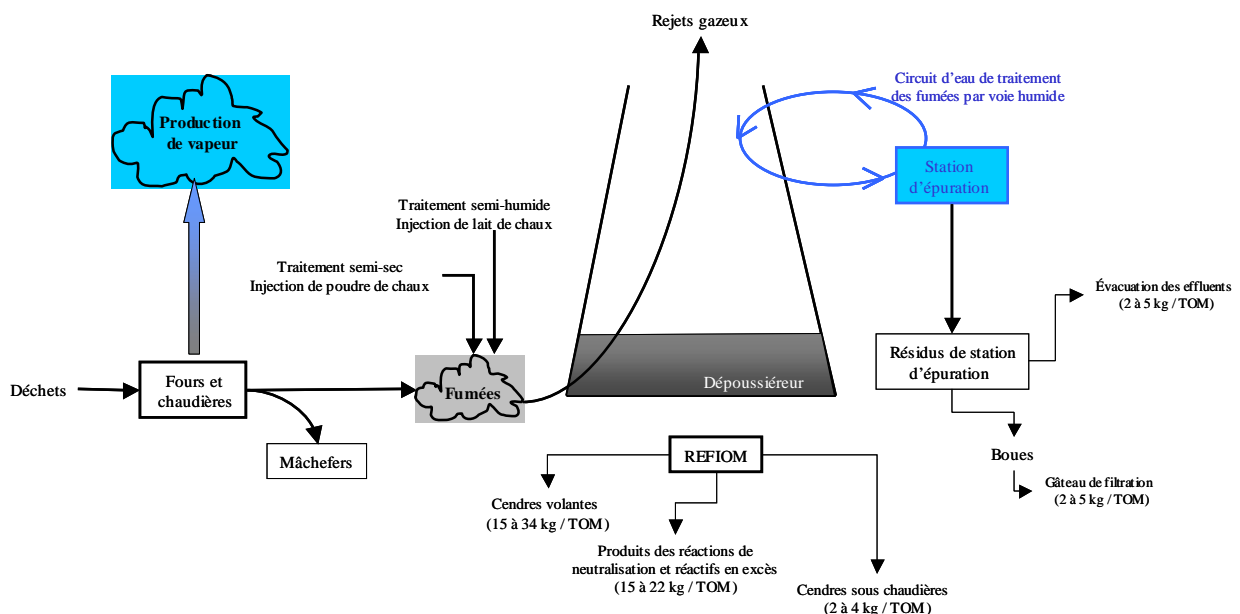


Figure 3 : Schéma de principe des différents procédés mis en œuvre sur une usine d'incinération. Source : CAMARD et FRANCONI, 2005

□ Probabilités de constitution d'un réservoir.

Les fosses de stockage des déchets ménagers sont dimensionnées pour accueillir l'équivalent de 2 à 3 jours de collecte, ainsi le temps de séjour peut aller de quelques heures à plusieurs jours. Les ordures ménagères qui y sont déversées contiennent de 30 à 40 % d'humidité. Enfin, *Legionella pneumophila* et certains protozoaires dont des hôtes potentiels, comme les amibes des genres *Acanthamoeba* et *Naegleria*, ont déjà été répertoriés parmi les micro-organismes présents dans les ordures ménagères fraîches (Delery *et al.*, 2003). Les quantités respectives ne sont cependant pas disponibles. **Le temps de séjour, l'humidité importante et la flore associée qui règnent dans les fosses de stockage pourraient être *a priori* compatibles avec le développement de *Legionella*, notamment dans les zones où le biofilm est le plus important.**

Dans le cas des installations recevant des boues (liquides ou solides), ou bien encore des composts de qualité agronomique insuffisante, le risque de constituer un réservoir est accru, d'une part du fait d'un apport supplémentaire possible en légionelles et d'autre part du fait de la modification du contenu de la fosse (apport de micro-organismes variés, apport d'humidité, ...). **La présence de boue ou de compost sur un site d'incinération, peut certainement être considérée comme un facteur de risque supplémentaire.**

□ Probabilités d'émission d'aérosols.

D'une manière générale, sur l'ensemble des sites, le grappin alimentant la trémie ou homogénéisant les déchets génère des aérosols. De manière plus spécifique, certaines unités, comme les installations fonctionnant avec un four à lit fluidisé, impliquent des étapes de broyage des déchets de sorte à obtenir une taille des résidus comprise entre 50 et 300 mm. **Les procédés de pré-traitement (broyage - déchiquetage) ou d'homogénéisation des déchets sont à l'origine d'aérosols.**

Par ailleurs, les dispositifs annexes à la combustion des déchets sont à prendre en compte sur les différents types d'installation. Par exemple, on peut citer les mécanismes de ventilation forcée des fours, les dispositifs de traitement des fumées, les dispositifs de valorisation de la chaleur fournie par l'incinération des déchets (chaudière), les dispositifs de traitement de l'air intérieur de l'unité. Tandis que la ventilation forcée est favorable au mouvement d'air, les dispositifs de traitement des fumées, les procédés de traitement de l'air du site et les systèmes développés pour la récupération de la chaleur produite font appel à des circuits d'eau. **La proximité de matrices organiques potentiellement contaminées et de milieux hydriques à température modérée ou élevée (systèmes de lavage des fumées, de l'air ou systèmes de refroidissement) constitue sans doute une situation qui pourrait aboutir à la contamination de certains réseaux d'eau de l'unité.**

II-2) LA CO-INCINERATION ET LES PROCÉDES THERMIQUES

II-2-1) Description succincte de la co-incinération :

Dans les procédés de co-incinération, l'objectif essentiel est de produire soit de l'énergie, soit des produits matériels à partir de la combustion de déchets dans des installations dimensionnées initialement pour brûler un combustible. Les déchets susceptibles d'être éliminés par co-incinération sont des sciures, des déchets de bois, des plastiques, des farines animales, des résidus agricoles, des résidus de l'industrie agroalimentaire, des boues séchées de STEP.

La co-incinération est pratiquée dans les cimenteries, les usines de chaux, éventuellement les centrales thermiques. Dans le cas des cimenteries, les déchets peuvent constituer une matière première du cru, ils sont alors brûlés au niveau du four principal. Dans les autres cas, ils sont brûlés soit au niveau du brûleur principal (celui du four), soit au niveau de brûleurs dit secondaires qui sont par exemple utilisés dans l'étape de calcination (élimination du CO₂ produit pendant la combustion). Le recours à un conditionneur de charge est classique car il assemble les déchets de sorte à fournir un mélange aux capacités calorifiques constantes.

II-2-2) Description succincte des procédés thermiques :

Les procédés thermiques se différencient de l'incinération et de la co-incinération par une oxydation des déchets non pas totale mais partielle. Ces procédés sont l'oxydation ménagée (présence réduite d'oxygène) ou la thermolyse (absence d'oxygène) et peuvent être regroupés sous le terme de pyrolyse. Les procédés de pyrolyse mettent en jeu des températures minimales de 400°C et maximales de 2000°C. Ils aboutissent à la production de noir de carbone, de fractions minérales (verre, céramique, terre) et métalliques et de résidus liquides dont les caractéristiques se rapprochent parfois du pétrole.

La technique peut traiter les mêmes déchets que ceux traités par l'incinération cependant il semble que la pyrolyse soit surtout réservée à des déchets organiques responsables de difficultés dans les procédés d'incinération : déchets contenant de fortes concentrations en chlore, azote, soufre, sels et métaux fusibles ou volatils qui entraînent la corrosion du four ; les métaux et plastiques susceptibles de se solidifier dans le four au contact de l'apport en air comburant, déchets générant de trop grandes quantités de cendres.

II-2-3) Analyse des installations de co-incinération et de traitement thermique.

□ Probabilités de constitution d'un réservoir.

Comme pour les usines d'incinération les points sensibles sont les zones de stockage des déchets et les installations annexes à la production des matériaux ou de l'énergie sont à prendre en compte dès lors que des circuits d'eau réchauffée sont utilisés. Les installations de traitement des fumées présentes dans tous les procédés, ainsi que les étapes de refroidissement du coke (« trempe » à l'eau, transport en vis refroidie à l'eau) rencontrées dans les unités de pyrolyse, sont potentiellement concernées.

□ Probabilités d'émission d'aérosols.

Les températures de fonctionnement des fours assurent l'absence de bioaérosols infectieux. En revanche, les déplacements des déchets (y compris les opérations d'introduction dans le four) et les étapes de pré-traitement (broyage – déchiquetage) sont génératrices d'aérosols. Ainsi, en co-incinération, le bois et les matières organiques agglomérées en brique sont broyés. Dans les procédés de pyrolyse, l'étape de granulation se traduit également par le broyage ou le déchiquetage des déchets. Enfin, des opérations de tri avec soufflage peuvent être employées en amont des étapes de broyage.

II-3) L'OXYDATION HYDROTHERMALE (OXYDATION FROIDE)

L'oxydation hydrothermale (OHT) permet une oxydation de la matière organique en phase liquide. Les rendements d'oxydation de la matière organique sont compris entre 70 et 99 %. Suivant l'efficacité du procédé qui dépend des conditions de pression, de température et de la nature du déchet, un traitement supplémentaire en station d'épuration peut compléter la filière.

II-3-1) Déchets potentiellement traités :

L'OHT est bien adaptée aux déchets contenant une forte proportion en eau. Elle s'applique aux boues, aux eaux de process, éventuellement à des déchets industriels liquides, comme les encres, les colles, les vernis, les peintures, les huiles, les solvants, les déchets aqueux de la chimie organique. Les déchets traités doivent présenter une taille réduite afin d'être compatibles avec l'obtention d'une phase aqueuse. Si nécessaire un broyage très fin (<0,5 µm) est réalisé. La matière sèche peut atteindre 15% mais demeure généralement < à 4%.

II-3-2) Analyse des installations d'oxydation hydrothermale :

Suivant les conditions de température et de pression appliquées pendant le procédé, l'oxydation est dite sous-critique ou supercritique (en référence à l'état thermodynamique de la phase aqueuse pendant le procédé). En conditions sous-critiques la température reste inférieure à 330°C et la pression ne dépasse pas 150 Bar. De l'oxygène est apporté soit par l'insufflation d'air enrichie ou non en oxygène, soit directement par l'injection d'oxygène pur. Dans le cadre des conditions supercritiques, la température est supérieure à 374°C et la pression dépasse 221 Bar. L'OHT met donc en jeu des conditions de température (de 250 à 550°C) et de pression (250 Bars) qui éliminent les risques de bioaérosols infectieux. En revanche, la phase de pré-traitement des déchets reste, comme pour beaucoup des autres procédés déjà discutés, l'étape la plus critique. Le stockage des déchets puis leur réduction à l'état de boues sont propices à la génération de bioaérosols. Le traitement de boues de STEP constitue un facteur de risque supplémentaire.

II-4) LES TRAITEMENTS BIOLOGIQUES DES EFFLUENTS URBAINS OU INDUSTRIELS

II-4-1) Description succincte et données générales

L'assainissement a pour objet d'assurer la collecte, le traitement, puis le rejet des eaux usées et pluviales. En 2001, plus de 16 000 stations d'épuration étaient répertoriées sur le territoire français (IFEN, 2004).

La station d'épuration située à l'extrémité du réseau de collecte assure le traitement et le retour au milieu naturel des effluents urbains ou industriels. La taille des stations est fonction des volumes à traiter. Les procédés associés au sein d'une filière d'épuration étant dépendants des caractéristiques de la sensibilité du milieu naturel receveur ainsi que de la nature des effluents à traiter, il existe de très nombreuses configurations de stations d'épuration. Les schémas fondamentaux de fonctionnement sont cependant figés de sorte qu'il est possible de décrire les stations d'épurations selon 3 à 4 grandes phases consécutives de traitement : Pré-traitement, traitement primaire, traitement secondaire et plus rarement traitement tertiaire. Au cours de l'épuration, les polluants sont traités successivement depuis la fraction particulaire (débris plus ou moins grossiers, sables), jusqu'aux matières en suspension et aux substances dissoutes en particulier la matière organique. Le pré-traitement et le traitement primaire s'appuient sur la taille et la densité des déchets à éliminer. Le traitement secondaire est également classiquement dénommé traitement biologique car il utilise la capacité des microorganismes à se développer aux dépens de la pollution transportée par les eaux usées. Le traitement tertiaire est variable en fonction du but recherché (abattement de la charge microbienne, élimination de pollutions spécifiques). La figure 4 expose le fonctionnement schématique d'une station d'épuration classique.

□ Le procédé.

En France, dans la majorité des cas, des rejets de qualité satisfaisante sont obtenus sans traitement tertiaire. Le pré-traitement et le traitement primaire sont peu variables d'une station à une autre, en revanche le traitement secondaire présente plusieurs variantes possibles. En effet, le traitement biologique peut faire appel à deux types de procédés qui diffèrent selon que les bactéries utilisées pour le traitement sont fixées à un support ou non. Les lits bactériens et les bio-filtres sont à classer parmi les méthodologies à bactéries fixées, à l'inverse le lagunage et les bassins à boues activées constituent les procédés à bactéries libres. Dans leur majorité, les stations d'épuration françaises utilisent des bassins à boues activées, en particulier celles qui traitent des charges supérieures à 2 000 équivalents-habitants.

Les rejets pollués sont amenés jusqu'à la station en transitant très souvent par un poste de relevage. Les éléments les plus grossiers sont éliminés (dégrillage/tamassage) puis la vitesse des effluents est diminuée pour permettre le dépôt des sables et la remontée en surface des graisses. A ce stade, les pollutions restantes sont essentiellement dissoutes et sont traitées par voie biologique au niveau de bassins à boues activées. Un brassage et une aération forcés sont maintenus dans ce bassin afin de favoriser la dégradation et l'assimilation des matières organiques par les bactéries présentes. Le

traitement biologique peut être orienté pour éliminer des pollutions spécifiques en fonction des espèces de bactéries introduites et maintenues dans les bassins d'aération. Finalement au terme d'une étape de clarification la station permet de séparer d'une part les boues issues du traitement et d'autre part les eaux épurées ou traitées rejetées dans le milieu naturel.

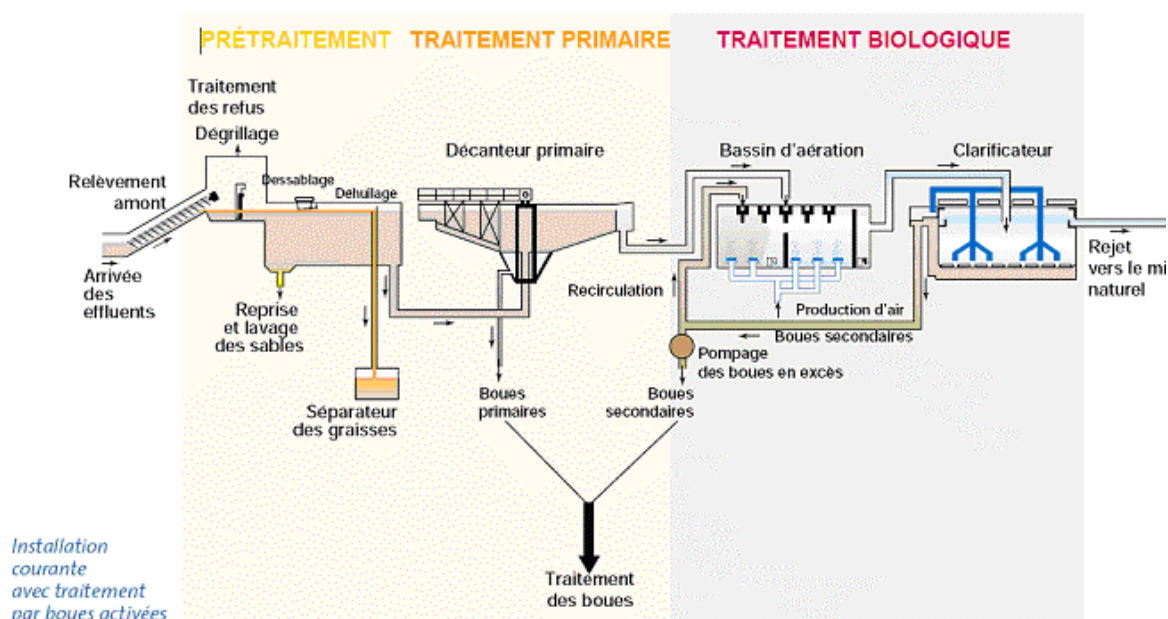


Figure 4 : Schéma de principe d'une station d'épuration classiquement rencontrée en France. (Document INRS)

(Source : [http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/1C527E0572B3825EC1256F560054BBA1/\\$File/ed5026.pdf](http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/1C527E0572B3825EC1256F560054BBA1/$File/ed5026.pdf))

Le lagunage représente une alternative de traitement biologique. Après un pré-traitement et généralement un traitement primaire (*a minima* une décantation passive) les effluents sont orientés vers une succession de bassins d'eau peu profonds (moins de 1,5 m) généralement au nombre de 3 et dont le dernier peut être planté en végétaux. L'oxygène nécessaire au développement des bactéries et donc au traitement des matières organiques en suspension est apporté par les échanges avec l'atmosphère mais surtout par l'activité photosynthétique d'algues. Des aérateurs sont parfois utilisés pour optimiser les rendements de digestion et diminuer les surfaces au sol des bassins. Dans les derniers bassins la charge microbienne est réduite par l'action des UV solaires. Le lagunage est utilisé pour des charges généralement inférieures à 2 000 équivalents-habitants.

❑ Les déchets traités

Ils peuvent être dissociés en trois catégories :

Les effluents domestiques constitués par les eaux de ménages (eaux d'éviers, lavabos, douches, baignoires, appareils ménagers), les eaux de vannes (eaux des toilettes) et les eaux de pluie ou de drainage.

Les effluents issues d'activités professionnelles assimilables aux eaux domestiques (charge en matière organique compatible, absence d'éléments nocifs au fonctionnement des STEP et absence d'éléments toxiques).

-les effluents industriels nécessitant un traitement dédié.

Les stations urbaines traitent les rejets domestiques et les eaux pluviales. Les effluents non-domestiques ne peuvent rejoindre le réseau de collecte qu'après autorisation de raccordement dans le cadre d'une convention de déversement ; la collectivité gestionnaire du réseau vérifiant préalablement la compatibilité avec les procédés de la station d'épuration. Les effluents industriels font généralement l'objet d'un traitement qui permet leur rejet directement dans le milieu naturel ou dans le réseau général.

La nature et le volume des effluents traités pas une station d'épuration peut varier considérablement en fonction de la saison.

II-4-2) Analyse des STEP.

□ Probabilités de constitution d'un réservoir.

Comme évoqué précédemment les *Legionella* sont des bactéries classiquement retrouvées dans l'environnement en particulier dans le compartiment hydrique. Bien qu'il n'y ait pas de données sur la présence de *Legionella* dans les effluents entrants, l'hypothèse peut être faite que ces derniers (domestiques ou industriels) concourent à un apport en *Legionella* dans les réseaux d'assainissement et les STEP. Au travers des quantités de *Legionella* potentiellement émises et des volumes d'effluents acheminés la question se pose du rôle joué par des sources ponctuelles fortement émettrices : l'apport direct de telles sources serait-il en mesure d'entraîner une contamination significative de volumes d'effluents importants et constamment renouvelés. Certainement que non, le risque d'effluents fortement contaminés par des *Legionella* se justifie par une autre hypothèse qui est celle de la multiplication dans les réseaux d'assainissement et au sein des structures de traitement des STEP. Le biofilm de ces installations devant manifestement jouer un rôle important. La forte charge en microorganismes dans ces matrices constituant un frein à l'utilisation des méthodes classiques de recherche des *Legionella* par culture sur milieu gélosé, les niveaux de contamination dans ces structures sont restés longtemps ignorés.

Malgré tout, et comme précédemment évoqué au niveau du rôle de réservoir potentiel des boues de STEP (§ G-I-3) Stampi *et al.*, (2000) dénombraient 3 % d'échantillons permettant la culture de *Legionella* parmi 241 échantillons d'effluents de STEP collectés. Plus récemment et grâce au développement de méthodes moins sensibles à la flore associée (méthode PCR), plusieurs études ont également démontré la présence de *Legionella* dans les effluents de STEP : Dès 1993, Palmer *et al.*, utilisaient avec succès la PCR mais aussi des méthodes d'immunofluorescence et de culture pour montrer la présence de *Legionella* dans des effluents de station d'épuration au niveau de l'ensemble des phases de traitement des effluents et notamment dans les effluents rejetés dans le milieu naturel. Dans cette étude très complète d'un an, les analyses PCR bimensuelles réalisées sur l'ensemble des effluents de la filière, ont montré la persistance d'une contamination en *Legionella spp.* Des niveaux supérieurs à 1 000 *Legionella* par ml (estimations réalisées sur la base des résultats PCR) ont été systématiquement retrouvés tout au long de l'étude et sur l'ensemble des effluents de la filière. Par ailleurs et de manière très intéressante, sur l'un des sites étudiés, des *Legionella* ont pu être mise en évidence par PCR mais aussi par immunofluorescence et par culture (en quantité 20 fois moindre que celle déterminée par PCR). Des travaux complémentaires menés par la même équipe (Palmer *et al.*, 1995) sur 5 STEP ont confirmé ces données. Des observations similaires ont été faites par Catalan *et al.*, (1997) qui indiquaient pouvoir détecter abondamment *Legionella pneumophila* par PCR dans différentes eaux usées ! Pascual *et al.*, 2001 faisaient état de la mise en évidence (toujours par PCR) de *Legionella pneumophila* dans les bioaérosols prélevés dans l'environnement de STEP. L'étude la plus informative sur le rôle de réservoir potentiel des ouvrages d'épuration demeure celle de Gregersen *et al.*, 1999 lesquels se sont attachés à démontrer le rôle joué par les décanteurs (aérosols et boues) d'une STEP d'industrie agroalimentaire. Des concentrations très importantes de l'ordre de $1,5 \cdot 10^7$ UFC de *L. pneumophila sg. 1* par gramme de boue auraient ainsi été retrouvées du fait d'investigations consécutives à l'observation de cas groupés de fièvre de Pontiac sur du personnel de maintenance. Enfin l'épidémie de légionellose de Harnes a montré la présence de *Legionella* dans un certain nombre de STEP de la zone investiguée, mais surtout a montré de fortes contaminations au sein d'une STEP et d'une lagune industrielle.

A l'analyse de ces résultats, les *Legionella* semblent en mesure de trouver les conditions compatibles avec un développement parfois très important. La diversité des micro-organismes, les fortes teneurs en matière organique caractéristiques des effluents de STEP constituent effectivement un milieu favorable au développement des légionelles. Palmer *et al.*, (1995) évoquent le rôle que pourrait jouer non seulement les différents bassins mais également les biofilms des canalisations des structures d'épuration.

□ Probabilités d'aérosolisation.

Les stations d'épurations sont des ouvrages dont les effluents sont en renouvellement permanent, leur simple circulation dans les ouvrages mais surtout les procédés mis en œuvre dans le processus épuratoire génèrent de fortes quantités d'aérosols. Très tôt la possibilité que les stations d'épuration pouvaient disséminer de fortes quantités de bioaérosols potentiellement infectieux a été soulignée cependant il ne semble pas que l'un de ces ouvrages ait déjà été impliqué dans une épidémie (Fannin *et al.*, 1985, Brandi *et al.*, 2000). Depuis les postes de relevage des eaux jusqu'au rejet dans le milieu naturel chaque phase de traitement crée des aérosols. Le tableau 10 suivant synthétise les principales étapes susceptibles de générer des aérosols.

Karra et Katsivela, (2007) ont mesuré les émissions de bioaérosols sur une station à boues activées aux différentes étapes du traitement (pré-traitement, décanteur primaire, bassin d'aération, décanteur secondaire). Sur la base du dénombrement de la flore aérobique revivifiable mésophile cultivable sur milieu gélosé, **les plus forts niveaux d'aérosols ont été enregistrés au niveau du pré-traitement.** Par ailleurs, dans la même étude il est fait mention d'une diminution progressive du nombre de microorganismes aérosolisés au fur et à mesure de la progression du procédé d'épuration. Plus spécifiquement, Brandi *et al.*, (2000), se sont intéressés à l'effet des modes d'aération utilisés dans les bassins à boues activées : **de moindres quantités d'aérosols seraient générées lorsque des buses de diffusion sont utilisées à la place de procédés d'aération mécaniques.** Pour un système d'aération mécanique, à une distance comprise entre 2 et 10 m sous le vent, une flore aérobique revivifiable d'environ 5.10^2 UFC/m³ est relevée tandis que celle-ci n'est plus que de 10^2 UFC/m³ lorsque des buses de diffusion sont employées. Des variations saisonnières sont également observées par exemple entre le printemps et l'été, avec une augmentation au minimum d'un facteur 5 et au maximum d'un facteur 20 en fonction du procédé et de la distance d'éloignement. Ainsi la concentration maximale observée est de 5.10^3 UFC/m³ à 10 m d'un bassin à boues activées agité mécaniquement. Les valeurs fournies par Fannin *et al.*, 1985 sont concordantes puisque de l'ordre de 10^2 UFC/m³ (flore aérobique revivifiable). Des variations journalières sont également possibles (Fannin *et al.*, 1985) notamment entre les périodes diurnes et nocturnes. Enfin des conditions particulières telles que les structures couvertes sont également à prendre en compte dans la mesure où le niveau de bioaérosols est susceptible d'être significativement augmenté dans un espace clos.

A noter que la plupart des études citées ont concentré la recherche de bioaérosols à proximité immédiate des installations des stations si bien que les informations obtenues sont peu informatives par rapport à l'exposition des populations riveraines. Il semble cependant que des bioaérosols en provenance de STEP puissent facilement être détectables jusqu'à 250 m de la structure sous le vent (Fannin *et al.*, 1985).

Le cas des lagunes méritent également d'être souligné puisque des procédés d'aération sont parfois associés aux bassins afin d'améliorer l'activité biologique et de réduire les surfaces occupées au sol. En l'absence de travaux sur la thématique *Legionella* et lagunage, l'épisode de cas groupés intervenu dans la région de Lens en 2003, constitue un exemple concret d'une contamination d'un bassin avec émission de bioaérosols (Cf. partie F).

Au-delà de la présence de nombreux bioaérosols à proximité des STEP se pose la question de la présence de *Legionella* parmi les bactéries disséminées. Les données sont rares mais par exemple, Palmer *et al.*, 1995 ont montré que des *Legionella* pouvaient être mises en évidence dans l'air situé à proximité d'un bassin à boues activées d'une STEP non seulement par PCR mais également par immunofluorescence et par culture sur milieu gélosé. Ainsi sur les 9 échantillons d'air analysés 4 se sont révélés positifs par au moins l'une des méthodes. En revanche Fracchia *et al.*, 2006 soulignent l'incapacité à détecter des *Legionella* dans les bioaérosols de deux STEP à partir de prélèvements d'air réalisés avec un impacteur sur gélose. En l'absence d'une méthode éprouvée pour le prélèvement et le dénombrement des *Legionella* dans les bioaérosols et en l'absence également d'un nombre d'études important, il est difficile de conclure globalement sur le niveau de contamination des STEP, cependant la diffusion aérienne de *Legionella* à partir d'ouvrage d'épuration a été mise en évidence au moins ponctuellement.

Tableau 10 : Détails des opérations susceptibles de générer des aérosols au niveau des procédés d'épuration des eaux usées (le traitement tertiaire n'est pas abordé).

	Etapas du procédé épuratoire	Polluants éliminés	Principe du traitement appliqué		Matériels spécifiques mis en œuvre	Risque d'aérosolisation
			Principe de base	Procédés complémentaires		
PRETRAITEMENTS	1 Dégrillage	Déchets grossiers	Filtration	Tamisage sur grille au maillage réduit	Grilles et tamis	OUI
	Relevage	/	/	/	Vis d'Archimède Pompes	OUI
	2 Désablage	Sables (particules de diamètre > à 200 µm)	Sédimentation par ralentissement de l'écoulement	/	Bassins dédiés	NON
	3 Dégraissage	30 à 40% des graisses totales / Flottants	Flottation par ralentissement de l'écoulement	Insufflation de microbulles d'air	Diffuseurs de microbulles	OUI
TRAIEMENTS	PRIMAIRE	De 70 à 90 % des matières en minérales et organiques en suspension (abattement de 75% de la DBO) / fraction colloïdale	Agglomération des matières en suspension par la formation de floccs.	Insufflation de microbulles d'air	Turbine, diffuseur de microbulles, ...	OUI
					Bactéries libres : Boues activées avec aération forcée	Turbine, ...
	SECONDAIRE	Digestion biologique	Substances dissoutes (matières organiques)	Développement bactérien au profit de la matière organique dissoute.	Bactéries fixées : Lits bactériens et biofiltres Biofiltres Biodisques	Systèmes d'aspersion
	3 Clarification	Boues résiduelles	Décantation passive des boues	/	/	NON
REJET DES EAUX TRAITÉES			/		Déversoir	OUI

II-5) LES TRAITEMENTS BIOLOGIQUES DES DECHETS SOLIDES – LE COMPOSTAGE.

II-5-1) Description succincte et données générales.

□ Le procédé.

Le compostage est un procédé de dégradation aérobie de la matière organique non synthétique applicable aux déchets fermentescibles. Le caractère aérobie de la dégradation, caractéristique du compostage, implique une oxygénation suffisante du compost. L'assemblage de déchets réalisé en début de compostage doit conduire à des andains ou à un mélange dont la structure sera perméable à l'air ambiant. Aussi, à la base du compostage industriel, les déchets sont éventuellement broyés et mélangés à des co-produits structurants. Réalisé dans des unités spécialisées, le compostage aboutit à un terreau hygiénisé enrichi en composés humiques. Si le compost des déchets verts est facilement valorisé en agriculture, celui issu des autres déchets et notamment celui produit à partir d'ordures ménagères, semble de plus en plus destiné à une valorisation par incinération ou co-incinération.

Plusieurs techniques de compostage existent :

- le compostage en andains à l'air libre ou sous hall, avec une aération naturelle ou forcée.
- le compostage en silo ou en box. Ces derniers peuvent être ouverts ou couverts.
- le compostage en tunnel ou en containers.

Même si le compostage en réacteur permet un meilleur contrôle des conditions optimales (brassage, aération, taux d'humidité), en France, le procédé de compostage le plus représenté est le compostage lent avec des andains à l'air libre, notamment pour les déchets verts.

Plusieurs phases se succèdent ensuite au cours du processus.

- Dans un premier temps, les fortes concentrations en micro-organismes contenues dans les déchets conduisent au démarrage rapide d'une phase de fermentation thermophile : La forte activité microbienne qui découle de l'abondance en nutriments facilement assimilables (fraction légère de la matière organique – sucres, amidon, protéines), se traduit par une forte augmentation de la température. Du fait de l'inactivation de la flore microbienne initiale, la phase de fermentation thermophile est souvent appelée phase d'hygiénisation. Cette étape se caractérise également par une consommation importante en oxygène, elle est donc entretenue par des méthodes d'aération forcée telles que l'insufflation ou l'aspiration d'air au travers des andains. Plus simplement un retournement mécanique du compost permet également de maintenir de bonnes conditions d'oxygénation.
- Dans une seconde phase de digestion, la dégradation des matières organiques restantes (lignine, cellulose) s'opère. L'assimilation étant plus lente, le métabolisme bactérien est ralenti si bien que la température du compost diminue, il s'agit d'une phase de fermentation mésophile.
- Finalement, au cours d'une dernière étape, les déchets non dégradés ou partiellement dégradés sont éliminés (phase de criblage). Le compost mature est obtenu après 2 à 3 mois supplémentaires.

Le lombricompostage ou vermicompostage est une adaptation du procédé qui peut être mise en oeuvre pour des déchets non toxiques, sous réserve de la présence de calcaire, d'un taux d'humidité supérieur au compostage classique (50 à 60 % contre 35%) et d'une quantité disponible d'oxygène supérieur à 15%.

□ Les déchets traités.

D'une manière générale, les déchets des ménages et les matières organiques provenant d'animaux ou de végétaux sont susceptibles d'être compostés. Certaines matières organiques d'origine chimique peuvent également être dégradées par compostage. Les déchets entrant dans la filière de compostage peuvent être solides (paille, bois, boues déshydratées), liquides (lisier de porc, effluents des industries agroalimentaire, boues fraîches liquides) ou encore constituer des suspensions (boues de STEP épaisses).

Le compostage des ordures ménagères, nécessite obligatoirement un tri préalable afin d'éliminer les éléments non dégradables ou vecteurs de polluants.

La boue de station d'épuration est un substrat difficile à composter en raison de son taux élevé d'humidité et de sa texture. Elle est donc généralement déshydratée de manière à atteindre un taux de matière sèche au moins égal à 15 % puis compostée en mélange avec des déchets verts ou tout autre complément carboné (copeaux de bois, paille...) – (Noël *et al.*, 2002).

De part leur forte teneur en matière organique biodégradable et leur structure, les déchets verts se prêtent très bien au compostage (après broyage si nécessaire). Ils fournissent un compost de bonne qualité agronomique.

Le broyage des déchets avant mélange favorise l'homogénéité des conditions physico-chimiques pendant le compostage (notamment l'aération). Afin de faciliter l'aération, l'ajout de co-produits est largement pratiqué pour améliorer la texture. Les co-produits ajoutés sont variés : sciures, déchets verts, copeaux et plaquettes de bois, bois de rebut, papiers, cartons, boues calcaires, phosphogypses, cendres de bois,

II-4-2) Analyse des installations de compostage.

□ Probabilités de constitution d'un réservoir.

Le premier point en faveur de la constitution d'un réservoir de *Legionella* dans les centres de compostage est la contamination initiale des déchets traités. Comme discuté précédemment (§ G-I), les ordures ménagères et surtout les boues sont susceptibles d'amener des *Legionella* et une flore associée favorable à leur développement. Parmi les différents types de boues (liquides, pâteuses, déshydratées) admises en unité de compostage, il est probable que les boues liquides soient les plus à même de contenir des *Legionella*. En dehors de l'apport des déchets, les arrosages des composts, régulièrement réalisés, soit pour corriger un défaut d'humidité, soit pour limiter la diffusion des poussières au moment du retournement des andains, peuvent également être à l'origine d'un apport en *Legionella* via une contamination du réseau d'eau utilisé pour l'aspersion.

Le second point est la nature de la flore microbienne associée au compostage. Les caractéristiques de la flore microbienne évoluent significativement pendant le processus de compostage. Alors que, du fait des températures élevées et persistantes (maximum 70°C), la phase de fermentation thermophile élimine progressivement les bactéries fécales (plutôt mésophiles) les virus et certains parasites (Delaunay, non daté), d'autres micro-organismes s'implantent, en particulier des champignons microscopiques, des actinomycètes thermotolérants ou thermophiles. Ces micro-organismes s'imposent par leur résistance aux températures élevées et par la sécrétion d'inhibiteurs bactériens (CDC, 2000) ; **Cette première phase de sélection thermique semble favorable à la survie des *Legionella*, cependant la sensibilité de la bactérie aux inhibiteurs bactériens sécrétés par la flore persistante n'est pas connue.** Par la suite, alors que la température du compost s'abaisse, la proportion des champignons microscopiques et des actinomycètes décroît progressivement au profit d'une nouvelle diversité microbienne (bactéries, protozoaires, ...) (CDC, 2000). Dès lors que la fermentation thermophile est terminée, l'abaissement relatif de la température ainsi que la présence de nombreuses bactéries et de nombreux protozoaires sont favorables aux relations de commensalisme et de parasitisme elles-mêmes propices à la multiplication des *Legionella*. **La flore des phases de fermentation mésophile et de maturation semble favorable aux légionelles.**

Dans les cas particuliers des déchets fortement fermentescibles permettant d'atteindre des températures d'environ 70°C (pendant la fermentation thermophile), les *Legionella* sont certainement

inactivées, cependant à la faveur d'une disparité des conditions physico-chimiques à l'intérieur des andains, des populations bactériennes pourraient persister et s'implanter localement (notamment les *Legionella*); certaines zones de compost n'atteignent pas les valeurs requises pour une bonne hygiénisation (Damien, 2004).

Le troisième point propice à la constitution d'un réservoir est lié au pourcentage d'humidité. Le taux d'humidité peut varier en fonction de l'intensité de la fermentation, des fréquences d'arrosage, des conditions météorologiques (pour les composts à l'air libre). Cependant, dans les composts ce dernier est souvent supérieur à 35% (valeur recommandée pour les déchets bruts en début de procédé). Des taux de 45 à 60 % sont classiquement recherchés (Damien, 2004). L'humidification est réalisée, si nécessaire, au moment du mélange initial des déchets et surtout pendant les trois premiers mois. Un arrosage est généralement pratiqué à la fin de la phase thermophile afin de relancer l'activité bactérienne au détriment de l'activité des champignons microscopiques. Par ailleurs, certains appareils de retournement permettent un arrosage simultané de l'andain (destiné à réduire la dispersion des poussières). **Les conditions d'humidité maintenues pour favoriser l'activité bactérienne paraissent compatibles avec la survie des *Legionella*.**

Le 4^{ème} point favorable est apporté par les valeurs de pH : des pH compris entre 6 et 8 sont optimaux pour le compostage (Damien, 2004). La production de CO₂ et de vapeur d'eau au cours du processus de fermentation conduit à une diminution du pH, cependant la variation engendrée reste limitée car les matières organiques du compost présentent un pouvoir tampon. **Le pH de la biomasse reste favorable à la croissance des *Legionella* qui tolèrent des valeurs comprises entre 5,5 et 8,5** (Molmeret, 2001).

La figure 5 permet de reprendre les évolutions des conditions physico-chimiques pendant le compostage.

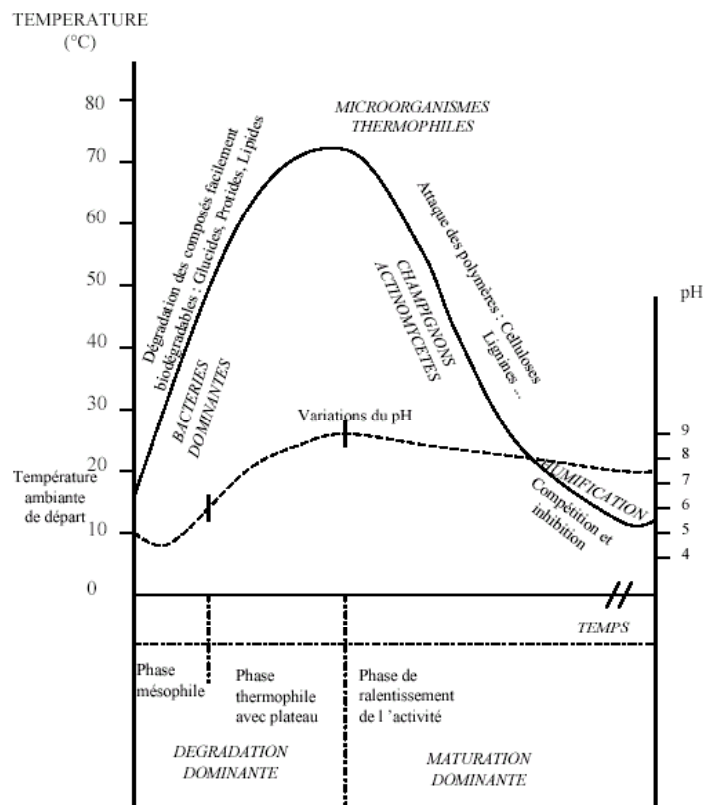


Figure 5 : Evolution de la température, du pH et du type de micro-organismes lors du processus de compostage des déchets (d'après Mustin, 1987).

- Probabilités d'aérosolisation.

En premier lieu des bioaérosols de *Legionella* peuvent être émis par le système d'aspersion destiné à contrôler le taux d'humidité du compost. Les niveaux de contamination en *Legionella* des eaux utilisées pour l'aspersion des composts sont donc à maîtriser.

En second lieu, les activités pratiquées par le personnel des centres de compostage génèrent également de nombreuses poussières et aérosols. Les principales sources d'émission de poussières ont été recensées (CDC, 2000), il s'agit des zones de décharge des déchets, de pré-traitement des déchets (broyage, homogénéisation), zone d'affinage (post-traitement) avec les opérations de criblage et de tamisage, les zones de retournement du compost, les zones de déplacement et de conditionnement du produit fini. Enfin, Les andains peuvent être disposés sur des grilles reliées à un réseau de tubes connectés à des ventilateurs qui soufflent ou aspirent l'air. **Les données bibliographiques sont concordantes sur le fait que 50 à 90% des particules mises en suspension intègrent la fraction alvéolaire. La voie d'exposition majeure du personnel est l'inhalation ; l'ingestion et l'exposition cutanée et celle des muqueuses sont beaucoup moins importantes (CDC, 2000).**

La forte exposition aux bioaérosols du personnel des centres de compostage est avérée comme en atteste l'abondante bibliographie qui décrit les différentes affections respiratoires recensées dans cette population. Les questions à aborder sont : des *Legionella* infectieuses sont-elles aérosolisées, si oui les affections respiratoires déjà rencontrées fragilisent-elles ces personnels ?

III) POINTS A RETENIR

1^{er} point : Quels sont les déchets susceptibles d'abriter des *Legionella*.

Parmi les 22 catégories de déchets recensées par Damien (2004) les déchets hospitaliers, l'ensemble bois non-traités et matières organiques naturelles et les boues et enfin les déchets ménagers ont retenu notre attention.

Concernant les déchets ménagers, il apparaît que la présence de *Legionella pneumophila* serait possible dans les déchets frais mais peu de données sont disponibles.

Concernant les déchets hospitaliers, il semble que le broyage réalisé en amont des étapes de décontamination soit la principale étape à risque, mais selon toute vraisemblance, cette matrice ne semble pas représenter un réservoir important.

Concernant l'ensemble bois non-traités et déchets verts, aucune étude ne permet pour l'heure de trancher sur l'absence ou la présence de *Legionella* dans ces matrices, cependant les conditions d'une colonisation initiale ou *a posteriori* (pendant les phases de stockage) ne semblent pas réunies.

Concernant les boues : Plusieurs éléments de la bibliographie sont favorables à l'hypothèse que les boues de STEP puissent être un réservoir. Les boues fraîches pourraient abriter des quantités importantes de *Legionella*, les données sur les concentrations dans cette matrice sont cependant rares. De même, le potentiel de survie des *Legionella*, au fur et à mesure de l'évolution des conditions physico-chimiques des boues et notamment au fur et à mesure des pertes en eau et des traitements d'hygiénisation, n'est pas étudié.

En première analyse, les boues de STEP constituent le déchet entrant le plus à risque.

Dans l'hypothèse où les boues liquides et relativement humides renfermeraient des *Legionella* en quantité importante, les installations ou les étapes de process à surveiller seraient :

- les bassins aérés des STEP ou des lagunes.
- l'épandage des boues, l'enfouissement consécutif et plus généralement toutes les étapes d'aspiration ou de déchargement.
- les zones de stockage sur les différentes filières de traitement.
- les zones de pré-traitement (mélange aux autres déchets, pré-traitement par broyage).
- les installations périphériques (circuits de refroidissement, unités de traitement des fumées, ...).

2^{ème} point : Le cas des filières de traitement autres que biologiques.

Dans les procédés d'incinération, de co-incinération, de pyrolyse ou d'oxydation hydrothermale il apparaît

- que les zones de stockages des déchets sont des **réservoirs potentiels**.
- que la proximité de matrices organiques potentiellement contaminées et de milieux hydriques à température modérée ou élevée (systèmes de lavage des fumées ou de refroidissement) constitue sans doute une situation qui pourrait aboutir à la contamination des réseaux d'eau d'une unité.
- que les phases de déplacement des déchets et les phases de pré-traitement (classiquement constituées par des opérations de broyage et de déchiquetage) sont potentiellement émettrices d'aérosols infectieux.
- que le traitement en lui-même (incinération, pyrolyse) n'est pas une phase critique.
- que le traitement de boues sur un site augmente vraisemblablement les risques associés à la constitution du réservoir et donc les risques liés à la dispersion de bioaérosols potentiellement infectieux.

Plus spécifiquement, les fosses des unités d'incinération constituent un bon modèle d'une zone de stockage de déchets. L'étude des fosses des unités d'incinération fait apparaître, que le temps de séjour, l'humidité importante et la flore associée qui règnent dans une fosse de stockage de déchets ménagers pourraient être *a priori* compatibles avec le développement de *Legionella*, notamment dans les zones où le biofilm est le plus important.

3^{ème} point : les stations d'épuration.

Les STEP constituent un cas particulier puisque l'essentiel des étapes concerne le traitement de déchets liquides au sein de phases également liquides. De plus ces ouvrages majoritairement associés à des procédés biologiques abritent de très fortes quantités de microorganismes.

- plusieurs études ont montré la présence de *Legionella* dans les effluents des STEP. Il semble que les différents bassins et canalisations de ces ouvrages puissent constituer des **réservoirs de la bactérie**
- les activités de traitement des STEP génèrent de **grandes quantités d'aérosols**.
- des *Legionella* ont été mis en évidence dans des aérosols de STEP notamment à proximité de bassins à boues activées.

4^{ème} point : Le compostage.

Comme les procédés épuratoires des STEP, le compostage est à distinguer des autres filières de traitement du fait des différences importantes qui caractérisent ce procédé (traitement biologique).

Les déchets en cours de compostage constituent un **réservoir potentiel** car :

- dans la première phase de fermentation thermophile la sélection thermique qui s'opère semble favorable à la survie des *Legionella* (cependant la sensibilité de la bactérie aux inhibiteurs bactériens sécrétés par la flore persistante n'est pas connue).

- dans la phase de fermentation mésophile et dans celle de maturation les flores qui s'installent progressivement pourraient être propices aux légionelles (apparitions de protozoaires dont des amibes hôtes de la bactérie).

- tout au long du procédé, les conditions d'humidité maintenues sont compatibles à la survie et au développement des *Legionella*.

- le pH de la biomasse reste favorable à la croissance des *Legionella* qui tolèrent des valeurs comprises entre 5,5 et 8,5

L'activité de compostage entraîne **l'émission de nombreux aérosols**, tout au long du procédé, or les données bibliographiques sont concordantes sur le fait que 50 à 90% des particules mises en suspension dans les unités de compostage, intègrent la fraction alvéolaire. De plus, l'émission d'aérosols peut parfois se dérouler en atmosphère humide et après de longues périodes de fermentation des déchets (retournement des andains). La voie d'exposition majeure du personnel est l'inhalation.

ETUDE DE CAS

H. Recherche de *Legionella* dans les boues entrantes et les composts d'un centre de compostage.

I) INTRODUCTION

L'analyse des données bibliographiques réalisée dans la première partie de ce rapport soulignait la présence éventuelle de *Legionella* dans les boues de station d'épuration. De la même manière, les centres de compostage sont apparus comme des structures présentant de nombreuses sources d'aérosols et par ailleurs susceptibles de constituer un réservoir potentiel pour les *Legionella*. Logiquement, le choix a été fait de porter l'étude de cas vers des centres de compostage accueillant des boues de station d'épuration. Outre l'avantage de réunir à la fois le traitement d'une matière valorisable d'emblée potentiellement contaminée et un procédé compatible avec le développement de *Legionella* pourvue d'un potentiel de dissémination d'aérosols, la filière de compostage des boues de station en mélange avec des déchets verts apparaît également intéressante à étudier du fait de son développement actuel dans le cadre de la politique de valorisation agricole des boues. Deux plateformes, pratiquant le compostage de boues urbaines et de déchets verts en mélange ont participé, mais l'essentiel de l'étude de cas s'est concentré sur un seul site.

Afin d'intégrer une première approche de la notion de survie des *Legionella* pendant les procédés de compostage, les sites de traitement retenus ont été choisis sur la base de la présence de *Legionella* dans les boues entrantes. Au terme de cette première sélection, des composts en phase de maturation issus de boues initialement contaminées ont donc pu être à leur tour soumis à la recherche de *Legionella*. **La recherche des *Legionella* dans les composts a donc été réalisée dans un contexte favorable à leur mise en évidence.**

II) NATURE DES ECHANTILLONS ET MODALITES DE PRELEVEMENT.

L'ensemble des prélèvements a été réalisé sur les sites de compostage soit directement par le personnel du site (cas des boues entrantes) soit par le personnel du laboratoire (cas des composts). Les échantillons ont été conditionnés dans des flacons stériles (en polyéthylène) d'une contenance de 500 ml et ont été rapidement acheminés vers le laboratoire (<48 h). Le nombre d'échantillons traités a été fonction de la disponibilité des matrices sur les sites (fréquences des livraisons de boues, stockage des composts, ...).

□ Concernant les boues :

Toutes sont issues de stations d'épuration urbaines. Les informations concernant les traitements appliqués aux boues avant leur arrivée au centre de compostage ne sont pas disponibles. Il s'agit cependant pour l'ensemble de boues pâteuses.

De sorte à pouvoir reconstituer un échantillon moyen d'environ 500 g en laboratoire, pour chaque boue entrante, 5 prélèvements ont été réalisés en des points différents (5 flacons par boue).

□ Concernant les composts :

Les composts sont produits à partir du mélange de déchets verts (refus de criblage) et de boues. Les boues de station ne sont pas mélangées entre elles, chaque compost résulte donc du traitement d'une seule boue. Après mélange mécanique du structurant (déchets verts) et de la boue, le mélange est stocké dans un bâtiment couvert pendant 2 à 3 mois puis la fermentation s'achève à l'air libre en 1 à 2 mois. Le produit issu de la fermentation est alors criblé puis maintenu en maturation à l'extérieur. Les composts étudiés sont donc tous des composts criblés en maturation et entreposés en tas à l'air libre sur le sol ou sur une dalle bétonnée.

Les échantillons moyens ont été constitués directement sur site : 4 à 5 prélèvements pratiqués avec une tarière ont été réalisés dans les tas de composts à une profondeur comprise entre 15 et 50 cm de la surface. Pour chaque tas, les points de prélèvement ont été choisis aléatoirement. Dès la fin des prélèvements, la température a été relevée à l'aide d'une sonde dans chacun des échantillons moyens. Deux flacons de prélèvement ont été constitués par compost.

□ Autres échantillons :

Les centres de compostage ayant accepté de participer à l'étude sont de tailles réduites avec des aménagements en relation avec les volumes de déchets traités. Aussi, le centre sur lequel s'est focalisé l'étude de cas ne possède pas de systèmes fixes d'aspersion des andains. En l'absence d'un tel système aucune analyse n'a pu être réalisée sur des échantillons d'eau d'aspersion. La structure des matériaux en compostage (mélange de boues et de déchets relativement grossiers) et l'agencement du site se sont avérés incompatibles avec la possibilité de prélèvement de matériaux en phase de fermentation, de sorte que les quantités de *Legionella* potentiellement présentes pendant cette étape n'ont pas pu être évaluées.

III) REALISATION DES ANALYSES.

Les analyses de boues entrantes et de composts ont été réalisées suivant des protocoles communs. Les *Legionella* ont été dénombrées soit par culture sur milieu gélosé sélectif, soit par quantification génomique (PCR quantitative). Les protocoles utilisés sont des adaptations des normes NF T 90 431 pour la culture sur milieu gélosé, et XP T 90 471 pour la PCR. Notamment pour les dénombrements sur milieu gélosé, les adaptations apportées sont destinées à s'affranchir des problèmes de flores interférentes classiquement rencontrés dans les matrices riches en micro-organismes.

□ Pré-traitement des échantillons :

Les boues de STEP entrantes et les composts étant de nature solide, une phase de remise en suspension a été nécessaire avant analyse :

25 g de boue brute équitablement répartis sur les 5 flacons de prélèvement disponibles par échantillon de boue (soit 5 g par flacon), ont été remis en suspension dans 500 ml d'eau désionisée stérile. Pour chaque boue entrante, une suspension à 5 % a ainsi été obtenue à partir d'un échantillon moyen.

12,5 g de compost prélevé à partir de l'échantillon moyen constitué sur le terrain, ont été remis en suspension dans 500 ml d'eau désionisée stérile. Pour chaque compost, une suspension à 2,5 % a ainsi été constituée à partir d'un échantillon moyen.

Dans les deux cas la remise en suspension est achevée par un broyage au warring blender.

□ Dénombrement des *Legionella species* et des *Legionella pneumophila* :

Le dénombrement a été réalisé soit par mise en culture sur milieu gélosé soit par PCR quantitative.

Analyse sur milieu gélosé : détermination du nombre de *Legionella* cultivables.

L'analyse a consisté en une adaptation du protocole décrit dans la norme NF T 90 431. Les modalités de concentration des échantillons, de décontamination et de dilution préalables aux ensemencements, ainsi que les milieux gélosés employés diffèrent de la norme.

Les phases de confirmation des colonies suspectes de *Legionella* demeurent conformes aux spécifications de la norme. Brièvement, les colonies suspectes identifiées selon leur morphologie (observation sous loupe binoculaire) sont soumises à un test d'exigence à la L-cystéine par essais de croissance sur milieux gélosés spécifiques. Les colonies exigeantes en L-cystéine sont confirmées comme appartenant au genre *Legionella*. Une étape supplémentaire d'identification basée sur une reconnaissance immunologique (agglutination des bactéries autour de billes de latex greffées à des anticorps anti-*Legionella*) permet la mise en évidence des *Legionella pneumophila* parmi les autres espèces.

Le résultat exprimé est celui déterminé à partir des conditions opératoires qui permettent d'obtenir le dénombrement le plus important.

Analyses par PCR quantitative : détermination du nombre global de *Legionella*

A partir des suspensions constituées, des analyses PCR ont été conduites en adaptant la norme XP T 90 471. Les modalités de concentration des échantillons, ainsi que les procédures d'extraction et de purification des acides nucléiques sont cependant spécifiques. Les étapes d'amplification ont été réalisées suivant la norme. Le dénombrement des *Legionella species* a été déterminé grâce à l'amplification du gène de l'ADNr 16S ; le dénombrement des *Legionella pneumophila* a été réalisé grâce à l'amplification du gène MIP.

La stratégie générale de prélèvement et d'analyses des boues et des composts est décrite dans la figure 6 suivante.

Modalités de prélèvement et d'analyses pour les boues et composts

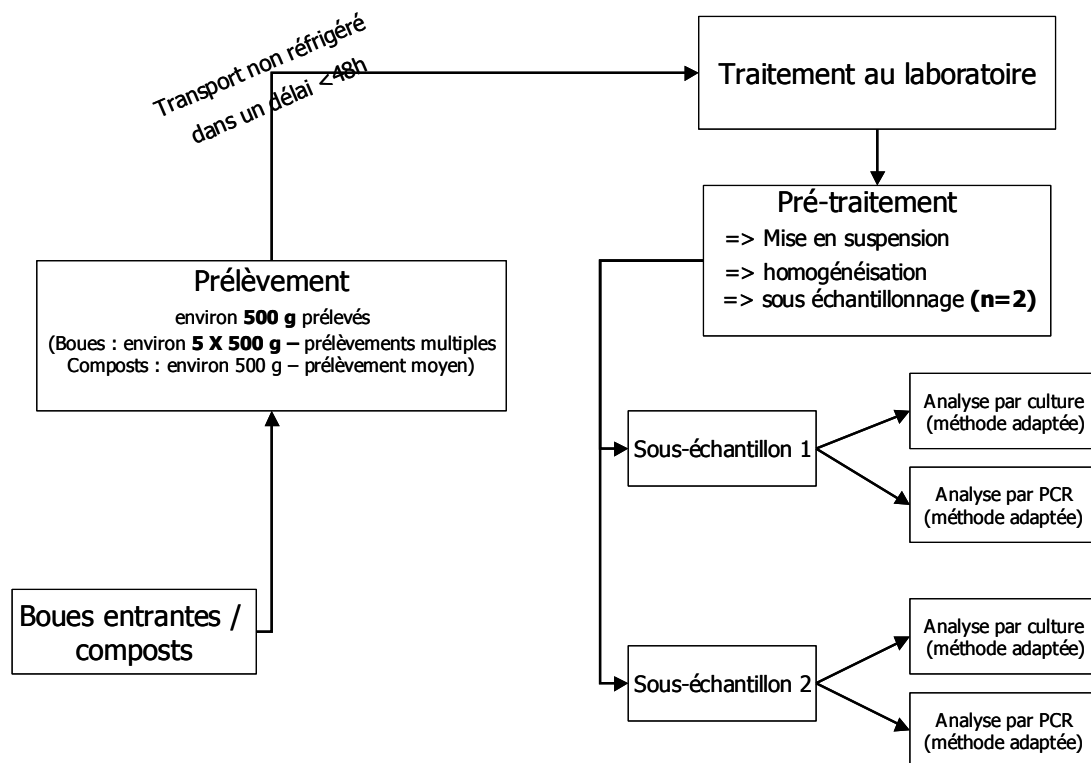


Figure 6 : Etude de cas, modalités de prélèvement et de fractionnement des échantillons pour la réalisation des analyses.

IV) RESULTATS

Sur les deux centres de compostage ayant collaboré, des boues entrantes ont été collectées en fonction des arrivages sur les sites. Quatre boues ont été obtenues sur le premier centre (C1) et une seule sur le second (C2). Chacune des boues a fait l'objet d'une analyse par culture et par PCR quantitative. Les résultats sont présentés dans le tableau 11.

Les résultats sont exprimés selon trois cas de figure constitués par la « non détection », la « présence » et la quantification. La notion de présence traduit la mise en évidence d'une faible quantité de *Legionella*. Des seuils de quantification, dont la valeur fluctue en fonction des conditions opératoires appliquées pour obtenir un résultat exploitable, sont associés en cas de non-détection ou de présence d'où par exemple l'expression de résultats de type « Présence < 500 » qui doit être interprétée comme la mise en évidence d'une faible quantité supposant au maximum la présence de 500 *Legionella* /g de boue brute.

Centre de compostage	Dénomination de la boue	Date de prélèvement	CULTURE		PCR Quantitative	
			UFC/g de boue brute		UG/g de boue brute	
			<i>Legionella spp.</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella spp.</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
C1	B	11/01/2007	Présence <500	Présence <500	21 000 000	4 100
C1	SH	11/01/2007	Présence <500	Présence <500	1 330 000	Non détectée <500
C2	N	18/01/2007	Non détectée <500	Non détectée <500	10 600	Présence <2 000
C1	SE	18/01/2007	Non détectée < 10 000	Non détectée < 10 000	167 000	34 200
C1	R	01/02/2007	1 000	Présence <500	162 000	Non détectée <500

Tableau 11 : Etude de cas, récapitulatif des dénombrements par culture et par PCR quantitative obtenus à partir des boues entrantes

L'observation des résultats de culture montre une présence modérée de *Legionella spp* et de *Legionella pneumophila* cultivables pour 3 des 5 boues analysées (B, SH, R). Aucune croissance de colonies de *Legionella* n'a été obtenue avec les 2 boues restantes (N et SE).

L'analyse par la méthode de PCR quantitative révèle la présence de génome de *Legionella spp* sur l'ensemble des boues avec cependant des niveaux extrêmement variables. Les boues B et SH se distinguent par de forts niveaux de contamination tandis que la boue N apparaît au contraire faiblement contaminée. Les boues SE et R présentent des contaminations modérées. Les quantités de *Legionella pneumophila* logiquement moins élevées (une seule espèce ciblée) présentent cependant de fortes variations entre les différentes boues.

Les deux méthodes ayant des niveaux d'information très différents (notamment unités différentes) la comparaison des quantifications est sans objet. En revanche l'observation des tendances apporte des informations : les boues présentant les plus fortes quantités de génomes de *Legionella spp* (B, SH et R) sont également celles pour lesquelles des *Legionella* cultivables ont été observées. La boue SE apparaît comme une exception mais l'absence de culture positive malgré une quantité de génome significative peut s'expliquer par les difficultés à obtenir des cultures exploitables comme le montre le seuil de quantification beaucoup plus élevé que pour les autres boues (10 000 UFC/g contre 500 UFC/g). Par ailleurs l'absence de cultures positives sur la boue N est également cohérente avec le faible signal de PCR quantitative observé sur le paramètre *Legionella spp*.

Ce qui doit être manifestement retenu est que :

- la boue N présente les plus faibles niveaux de contamination aussi bien par culture que par PCR (cohérence des deux méthodes).
- la méthode par culture permet de mettre en évidence des *Legionella* cultivables (spp et pneumophila) pour 3 des 5 boues étudiées (B, SH et R) avec des quantités homogènes et modérées.
- pour ces 3 boues, la PCR quantitative met en évidence d'importantes quantités de génome de *L. spp* confortant ainsi l'hypothèse d'une présence significative de *Legionella* dans ces échantillons.
- pour la boue SE, la culture est peu informative du fait de la présence d'une flore interférente difficile à éliminer, mais la PCR quantitative permet d'apporter une réponse par la mise en évidence de quantité de génome de *L. spp* équivalente à celle observée pour la boue R (boue positive par culture).

La présence de *Legionella* dans certaines boues du centre de compostage n°1 nous a amené à conserver ce centre pour la recherche de la présence de *Legionella* dans les composts. Trois composts en relation avec le traitement de boue en provenance des stations déjà étudiées dans la première phase ont pu être analysés. Il s'agit de composts obtenus avec les STEP B, SH et SE. Deux composts (B et SH) en relation avec des STEP dont les boues sont apparues les plus contaminées ont donc pu être analysés.

Le tableau 12 ci-dessous présente les données terrains disponibles concernant les composts étudiés.

Tableau 12 : Etude de cas, caractéristiques des composts étudiés.

Centres de compostage	Dénominations des composts	Dates de prélèvement	Durée de maturation après criblage	T°C de prélèvement	Caractéristiques
C1	B	12/03/2007	1 mois	38,5	Légèrement humide à collant / Présence d'amas
C1	SH	12/03/2007	7 jours	14	Aspect sec et aéré
C1	SE	12/03/2007	15 jours	42	Aspect sec et aéré

Le tableau 13 ci-après regroupe les résultats obtenus.

Tableau 13 : Etude de cas, récapitulatif des dénombrements par culture et par PCR quantitative obtenus à partir des composts criblés en phase de maturation.

Centre de compostage	Dénomination du compost	Date de prélèvement	CULTURE		PCR Quantitative	
			UFC/g de compost		UG/g de compost	
			<i>Legionella spp.</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella spp.</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
C1	B	12/03/2007	510 000	250 000	2 760 000	122 000
C1	SH	12/03/2007	240 000	200 000	1 260 000	40 000
C1	SE	12/03/2007	Présence < 40 000	Présence < 40 000	150 000	Présence <20 000

Au niveau des cultures, des quantités de *Legionella* cultivables importantes (*spp* et *pneumophila*) ont été mises en évidence dans les composts B et SH. Les quantités sont sensiblement équivalentes pour les deux origines de composts et ceci sur les paramètres *Legionella spp* et *Legionella pneumophila*.

La PCR quantitative indique également une présence importante de génome de *Legionella* dans les composts B et SH. Là encore les niveaux observés sur les deux composts sont homogènes aussi bien pour les *Legionella spp* que pour les *Legionella pneumophila*.

Le compost SE semble renfermer des quantités de *Legionella* plus faibles mais les seuils de quantifications élevés laissent supposer des contaminations encore potentiellement importantes (jusqu'à 40 000 UFC/l pour la culture et 20 000 UG/l pour la PCR quantitative sur le paramètre *L. pneumophila*).

Comme évoqué précédemment des comparaisons directes des dénombrements obtenus avec les deux méthodes ne seraient pas pertinentes, seul un parallèle entre les tendances décrites par l'une et l'autre méthode peut être réalisé. Il s'avère ainsi que la culture et la PCR quantitative affichent une bonne cohérence.

Un intérêt particulier doit être apporté au fait que les dénombrements par culture comme par PCR quantitative font apparaître la présence de *Legionella* pour les trois composts étudiés.

V) CONCLUSIONS

Avant toute conclusion, un point doit être fait sur les méthodes de dénombrement et la signification des résultats associés. Les outils de dénombrement des *Legionella* dans des matrices solides très chargées en bactéries telles que les déchets et notamment les boues de STEP ou les composts, restent à développer ou au mieux à valider. A l'exemple de ce qui a été réalisé dans cette étude, une utilisation à des fins prospectives, apporte néanmoins des informations précoces permettant d'apporter de premiers éléments d'information. Du fait du manque de maturité des méthodologies employées sur les matrices qui nous concernent (aussi bien en culture qu'en PCR quantitative), les dénombrements obtenus doivent encore être interprétés avec prudence. Malgré tout, plusieurs éléments confortent la présence de *Legionella* d'une part dans les boues entrantes et d'autre part dans des composts criblés en maturation. En effet, en accord avec le caractère ubiquiste des *Legionella*, la PCR quantitative montre la présence du génome de la bactérie dans l'ensemble des échantillons testés. De plus, les niveaux atteints, parfois très importants, attestent que *Legionella* peut être présente en forte quantité. Etant donné le faible recul disponible sur les méthodes de PCR quantitative il est permis d'afficher des doutes par rapport à l'interprétation précise qui doit être faite des résultats obtenus... Ceci n'est pas le cas pour les méthodes de culture sur milieu gélosé largement évaluées. Ainsi la mise en évidence de *Legionella* cultivables dans la majorité des 5 échantillons de boues entrantes testées et dans les 3 composts analysés renforce les observations PCR et confirment la présence des *Legionella*. La concordance relativement bonne entre les deux méthodes (cultures et PCR quantitative), en particulier pour les composts, fiabilise les résultats.

La fiabilité de l'outil analytique permet de poser un premier diagnostic sur le site de compostage étudié. Les résultats obtenus d'une part sur les boues entrantes et d'autre part sur les composts laissent à penser qu'il existe au moins deux réservoirs potentiels de *Legionella* sur le site de compostage investigué. **En ce qui concerne notre site d'étude, au regard des résultats observés sur les boues entrantes ou à l'analyse de la pratique qui consiste à utiliser les refus de criblage d'un compost (essentiellement composés par les débris grossiers de déchets verts) pour apporter un structurant aux boues entrantes, il semble que dans de nombreux cas des *Legionella* puissent être présentes dans les mélanges dès le début du procédé de compostage.** L'étude de cas réalisé ne permet pas d'apporter de précision sur l'évolution des quantités de *Legionella* pendant les phases de fermentation propres au compostage. La présence de *Legionella* dans les andains de ce site apparaît très probable, il ne s'agit cependant que d'une supposition. Enfin, le fait que des *Legionella* puissent être retrouvées dans des composts criblés en maturation indique manifestement *a minima* une persistance des bactéries pendant le traitement et n'exclut pas la possibilité d'une prolifération pendant les étapes du processus les plus favorables à la bactérie.

A ce stade de connaissance, l'extrapolation des observations propres à notre site d'étude vers la majorité des centres de compostage serait prématurée. En revanche, ces données pourraient certainement être exploitées pour orienter d'éventuelles études complémentaires sur d'autres sites de compostage. Il s'agirait dans un premier temps de confirmer la présence de *Legionella* sur d'autres plates-formes et dans un second temps si nécessaire, d'utiliser les outils analytiques de dénombrement pour établir l'analyse des filières concernées. **Si la présence de *Legionella* sur les plates-formes de compostages devait se confirmer une attention particulière devrait être apportée aux opérations de réception des boues entrantes, ainsi qu'aux opérations de criblage, de transport ou de manutention des composts. Par ailleurs, il pourrait être utile de répondre à des questions telles que : Toutes les boues sont-elles contaminées ? Pour les STEP générant des boues contaminées, la contamination est-elle constante tout au long de l'année ?**

I. CONCLUSIONS GENERALES

Ce document non exhaustif, pose les bases de la problématique des relations entre *Legionella* et déchets.

Dans une première approche, à partir de données bibliographiques, ce rapport aborde différents points précis comme l'écologie des *Legionella*, leurs exigences spécifiques et insiste par ailleurs sur les particularités qui les différencient de la majorité des autres genres bactériens (mutualisme, parasitisme). Postulant que l'exposition des individus passe par l'existence d'un réservoir de légionelles en mesure d'émettre des aérosols de très petites tailles, les différentes filières de déchets ont fait l'objet d'une analyse portant plus particulièrement sur ces deux points. Des étapes sensibles ont été soulignées dans chacune des filières, cependant **il ne s'agit que de pistes de réflexion qui en l'absence de confirmation, par des investigations analytiques de terrain par exemple, ne doivent pas être considérées comme des certitudes.**

Dans une seconde approche, les données bibliographiques du rapport sont étayées par des données « terrains » que constituent d'une part la description d'un épisode de cas groupés de légionellose (manifestement imputable à un site industriel) et d'autre part la réalisation d'une étude de cas prospective dédiée à la recherche de *Legionella* sur des plates-formes de compostage traitant des boues urbaines mélangées à des déchets verts. Rappelons que le choix d'étudier cette filière plus qu'une autre a justement été influencé par l'interprétation des données bibliographiques initialement synthétisées dans la première partie de l'étude (§ H-1).

Concernant l'apport d'informations générales permettant de situer le risque légionelle dans le contexte du traitement des déchets, cette étude a souligné plusieurs éléments importants.

En fonction de leurs spécificités les différentes filières, présentent des risques plus ou moins prononcés. Si certaines phases de traitement sont clairement dépourvues de risque, des étapes sensibles demeurent. En effet, dans la mesure où des filières accueilleraient des déchets potentiellement contaminés (déchets ménagers et/ou boues de STEP) **les phases de stockage, de transfert ou de prétraitement (broyage) pourraient alors constituer des étapes éventuellement sensibles.** Concernant les installations de traitement qui stockent des déchets, les données recueillies concernant les fosses de stockage dans les centres d'incinération peuvent être extrapolées. Ainsi, l'entreposage de déchets ménagers et de boues de STEP, en mélange ou non, pourrait conduire à la constitution de réservoirs. En l'absence d'aérosolisation le danger associé à ces réservoirs paraît modéré. Cependant, **les étapes de transfert des déchets, depuis la zone de stockage vers la zone de valorisation, semblent propices à l'émission d'aérosols. Les étapes de pré-traitement, plus élaborées, mettent souvent en jeu un broyage dont l'impact en terme d'émission de bioaérosols est plus marqué que celui des simples opérations de transfert depuis une zone vers une autre...**

Le traitement des déchets en lui-même est une étape moins exposée sauf dans le cas des filières intégrant des procédés biologiques. Dans les voies de traitement biologiques, les conditions physico-chimiques, la durée du processus, plus globalement la mise en oeuvre du traitement sont *a priori* favorables à la survie ou au développement de *Legionella*. La présence simultanée de matières organiques, de nombreux micro-organismes et éventuellement de chaleur (pour le compostage) sont les facteurs qui facilitent la présence de la bactérie. De plus les observations terrains montrent que dans les STEP, les lagunes et les centres de compostage, des aérosols sont souvent émis en quantité importante.

En premier abord, les installations de traitement des déchets apparaissent comme des installations concernées par la gestion du risque de légionellose. Cependant, il est important de rappeler qu'aucun épisode de cas groupés de légionellose ne semble imputable à une installation de traitement de déchets. Même les stations d'épuration et les centres de compostage qui apparaissent manifestement comme les installations les plus à risque n'ont jamais été impliquées.

La question de la présence de *Legionella* dans les filières de traitement est centrale. Cependant, les niveaux initiaux de contamination des déchets entrants dans les filières ne sont pas ou peu évalués. En l'état actuel des travaux, les sources bibliographiques fournissent seulement quelques estimations ponctuelles de concentration en *Legionella* dans des boues de STEP. De la même façon, les

quantités de *Legionella* présentes aux différentes étapes des filières de traitement sont peu connues. Plusieurs études ayant cependant été réalisées sur des bassins à boues activées, les filières des stations d'épuration sont certainement parmi les mieux caractérisées. Enfin, les potentiels de survie, de multiplication et de propagation au sein de chaque filière sont difficiles à déterminer car des données de caractérisation physico-chimiques précises manquent. Du fait de ce manque d'informations, l'analyse des données bibliographiques ne peut justifier que des présomptions de contamination. Seules des études de cas répétées sur un parc d'installations représentatif permettraient de vérifier le niveau de contamination réel à l'échelle d'une filière ou plus spécifiquement d'étapes pressenties critiques. Actuellement les données relatives d'une part aux deux sites de compostage et d'autre part à l'épidémie de légionellose de Harnes constituent cependant deux études de cas exploitables. Des informations sont effectivement apportées par ces deux études et il apparaît que des éléments mis en évidence dans la bibliographie sont concordants avec les données du terrain : présence de *Legionella* dans des boues de STEP ou de lagunes, présence de *Legionella* dans des composts, suspicion de dissémination de bioaérosols pendant les opérations de chargement ou de déchargement de déchets, propagation probable de bioaérosols infectieux sur des distances de plusieurs kilomètres.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abu-Kwaik Y., Gao L., Stone B., Venkataraman C., Harb O., 1998. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol.*, 64 (9) : 3127-3133.

Addiss D., Davis J., LaVenture M., Wand P., Hutchinson M., McKinney R., 1989. Community-acquired Legionnaires' disease associated with a cooling tower: evidence for longer-distance transport of *Legionella pneumophila*. *Am J Epidemiol.*, 130 (3) : 557-568.

Balty I. et Bayeux-Dunglas M., 2004. Légionelles et milieu de travail, Dossier Médico-Technique de l'INRS, Document pour le médecin du travail, n°98, 2ème trimestre 2004. http://www.inrs.fr/htm/legionelles_et_milieu_de_travail.html

Baskerville A., Fitzgeorge R., Broster M., Hambleton P., Dennis P., 1981. Experimental transmission of legionnaires' disease by exposure to aerosols of *Legionella pneumophila*. *Lancet*, 19-26 ; 2 (8260-61) : pp 1389-1390.

BEH, 2004. N°36-37, 7 septembre 2004. pp 173-182.
www.invs.sante.fr-beh-2004-36_37-beh_36_37_2004.pdf

Berger P., Papazian L., Drancourt M., La Scola B., Auffray J-P., Raoult D., 2006. Amoeba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia, *Emerging Infectious Disease*, 12 (2) : 248-255.

Berk S., Ting R., Turner G., Ashburn R., 1998. Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba spp.* *Appl Environ Microbiol.*, 64 (1) : 279-286.

Berendt R., 1980. Survival of *Legionella pneumophila* in aerosols : effect of relative humidity. *J. Infect. Dis.*, 141 (5) : 689.

Berendt R., Young H., Allen R., Knutsen G., 1980. Dose-response of guinea pigs experimentally infected with aerosols of *Legionella pneumophila*. *J. Infect. Dis.*, 141 (2) : 186-192.

Berendt R., 1981. Influence of blue-green algae (Cyanobacteria) on survival of *Legionella pneumophila* in aerosols. *Infect. Immun.*, 32 (2) : 690-692.

Bohach G., Snyder I., 1983. Cyanobacterial stimulation of growth and oxygen uptake by *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol.*, 46 (2) : 528-531.

Borella P., Montagna M., Romano-Spica V., Stampi S., Stancanelli G., Triassi M., Neglia R., Marchesi I., Fantuzzi G., Tato D., Napoli C., Quaranta G., Laurenti P., Leoni E., De Luca G., Ossi C., Moro M., Ribera D'Alcala G., 2004. *Legionella* infection risk from domestic hot water, *Emerg. Infect. Dis.*, 10 (3) : 457-464.

Borella P., Guerrieri E., Marchesi I., Bondi M., Messi P., 2005. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev.*, 11 : 355-380.

Brandi G., Sisti M., Amagliani G., 2000. Evaluation of the environmental impact of microbial aerosols generated by wastewater treatment plants utilizing different aeration systems. *J Appl Microbiol.*, 88 (5): 845-852.

Bretin P., Capek I., Cabanes P-A., Marcel F., Merchat M., 2004. Epidémie de légionellose dans le Pas-de-Calais, rapport de la mission d'appui. http://www.invs.sante.fr/publications/2004/legio_pas_de_calais/rapport_mission_pdc.pdf

Brouillard C, 2003. Sélection des agents biologiques prioritaires à prendre en compte dans l'évaluation des risques liés au retour au sol des déchets organiques d'origine urbaine en France métropolitaine et dans les DOM-TOM. Mémoire de fin d'études de l'ENSP, 191 pp. <http://ressources.ensp.fr/memoires/2003/igs/brouillard.pdf>

Bunger J, Antlauf-Lammers M, Schulz T, Westphal G, Muller M, Ruhnau P, Hallier E, 2000. Health complaints and immunological markers of exposure to bioaerosols among biowaste collectors and compost workers. *Occup. Environ. Med.*, 57 : 458-464.

Camard J-P. et Franconi A., 2005. L'incinération des déchets en Ile-de-France : considérations environnementales et sanitaires. IAURIF.

http://www.iaurif.org/fr/savoirfaire/etudesenligne/incineration_dechets/incineration_dechets.pdf

Campèse C., Jarraud S., Decludt B., Jacquier G., Che D., 2004. Les légionelloses déclarées en France en 2003. *Bull. Epidemiol. Hebd.*, 36-37 : 174-176.

Catalan V., Garcia F., Moreno C., Vila M., Apraiz D., 1997. Detection of *Legionella pneumophila* in wastewater by nested polymerase chain reaction. *Res Microbiol.*, 148 (1) : 71-78.

CDC : Center for Disease Control and Prevention, 2000. Legionnaires diseases associated with potting soil - California, Oregon and Washington, *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 49 (34) : 777-778.

<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4934a1.htm>

CSHPF : CONSEIL SUPERIEUR D'HYGIENE PUBLIQUE DE FRANCE, Section des eaux, Section des milieux de vie, Section des maladies transmissibles, 2001. Gestion du risque lié aux légionelles, 73 pp.

Cox C., 1989. Airborne bacteria and viruses, *Sci. Prog.*, 73 (292 Pt 4) : 469-499.

Damien A., 2004. Guide du traitement des déchets, DUNOD Paris, 2002, 2004, ISBN 2 10 007485 7, 431 pp.

David C. 2004. Déchets infectieux – Elimination des DASRI et assimilés. Doc INRS ED 918 – 52 pp.

Davis G., Winn W. Jr, Gump D., Craighead J., Beaty H., 1982. Legionnaires' pneumonia after aerosol exposure in guinea pigs and rats, *Am Rev Respir Dis.*, 126 (6) :1050-1057.

Delaunay N, non daté ; Une approche du risque microbiologique aéroporté dans une usine de compostage.

<http://www.ast67.org/PDF/compostage.pdf> et http://www.ast67.org/som_ast/enquete_ast/compost.htm

Delery, 2003. Données disponibles pour l'évaluation des risques liés aux bioaérosols émis par les installations de stockage des déchets ménagers et assimilés. Rapport de l'INERIS (INERIS DRC 03-45955/ERSA n°91). <http://www.ineris.fr/index.php?module=doc&action=getFile&id=201>

Delery *et al.*, 2006. Eléments de réflexion pour l'amélioration de la surveillance des installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air (rubrique n°2921) pour la gestion du risque légionelle. Rapport de l'INERIS (N°INERIS – DRC – 06 – 76471 - ERSa n°6).

<http://www.ineris.fr/index.php?module=doc&action=getFile&id=2625>

Dennis P., Lee J., 1988. Differences in aerosol survival between pathogenic and non-pathogenic strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1, *J. Appl. Bacteriol.*, 65 (2) : 135-141.

Douwes J., Thorne P., Pearce N., Heederik D., 2003. Bioaerosol health effects and exposure assessment : progress and prospects, *Ann. Occup. Hyg.*, 47 (3) : 187-200.

Edelstein P., 1993. Legionnaires' disease. *Clin. Infect. Dis.* 16 (6) : 741-747.

EPA, 1999. Environmental Protection Agency, Office of science and technology - Office of water Washington, DC 20460, EPA-822-R-99-001, *Legionella* : Human health criteria document

<http://www.epa.gov/waterscience/criteria/humanhealth/microbial/legionella.pdf>

Fabbi M., Pastoris M., Scanziani E., Magnino S., Di Matteo L., 1998. Epidemiological and environmental investigations of *Legionella pneumophila* infection in cattle and case report of fatal pneumonia in a calf. *J Clin Microbiol.*, 36 (7) : 1942-1947.

- Fannin KF, Vana SC, 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 (5) : 1191-1196.
- Fields B., Barbaree J., Shotts EB, Feeley J., Morrill W., Sanden G., Dykstra M., 1986. Comparison of guinea pig and protozoan models for determining virulence of *Legionella species*. *Infect Immun.*;53 (3) : 553-559.
- Friis L, 2001. Health of municipal sewage workers, ISBN 91-554-4980-8, 67 pp
- Fliermans C., 1985. Ecological niche of *Legionella pneumophila* in Legionellosis. Ed CRC Press Florida, 2, pp 75-118.
- Fliermans C., 1996. Ecology of *Legionella* : From Data to Knowledge with a Little Wisdom, *Microb Ecol.*, 32 (2) : 203-28.
- Fracchia L., Pietronave S., Rinaldi M., Giovanna Martinotti M., 2006. Site-related airborne biological hazard and seasonal variations in two wastewater treatment plants, *Water Res.* ; 40 (10) :1985-1994.
- Fraser D., Tsai T., Orenstein W, Parkin W., Beecham H., Sharrar R., Harris J, Mallison G., Martin S., McDade J., Shepard C., Brachman P., 1977. Legionnaires' disease : description of an epidemic of pneumonia, *N. Engl. J. Med.*, 297 (22) :1189-1197.
- Granguillot, 2004. Exposition des populations aux légionelles potentiellement contenues dans les panaches d'aéroréfrigérants des centrales nucléaires, Mémoire de l'école nationale de santé publique.
- Gregersen P., Grunnet K., Uldum S., Andersen, 1999. Pontiac fever at a sewage treatment plant in the food industry, *J. Work. Environ. Health*, 25 (3) : 291-295.
- Greub G., Raoult D., 2004; Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev.*, 17 (2) : 413-433.
- HA Thi-Lan, 2005. Etude de l'aérosol de *Legionella pneumophila*, Thèse de doctorat de l'université Paris XIII, N°5200069066, 121 pp.
- Hambleton P., Broster M., Dennis P., Henstridge R., Fitzgeorge R., Conlan J., 1983. Survival of virulent *Legionella pneumophila* in aerosols. *J Hyg (Lond)*, 90 (3) :451-60.
- Harf C. et Monteil H., 1988. Interactions between free living-amoeba and *Legionella* in the environment. *Wat. Sci. Tech.*, 20 : 235-239.
- Hebert G., Moss C. et al., 1980. The rickettsia-like organisms TATLOCK (1943) and HEBA (1959): bacteria phenotypically similar to but genetically distinct from *Legionella pneumophila* and the WIGA bacterium. *Ann. Intern. Med.*, 92 (1) : 45-52.
- Hechard Y., Ferraz S., Bruneteau E., Steinert M, Berjeaud J., 2005. Isolation and characterization of *Staphylococcus warneri* strain producing an anti-*Legionella* peptide, *FEMS Microbiol Lett*, 252 : 19-23.
- Heldal K., Halstensen A., Thorn J., Djupesland P., Wouters I., Eduard W., Halstensen T., 2003. Upper airway inflammation in waste handlers exposed to bioaerosols, *Occup. Environ. Med.*, 60 : 444 - 450.
- Heller R., Holler C., Sussmuth R., Gundermann K., 1998. Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Lett Appl Microbiol.*, 26 (1) : 64-68.
- Hryhorszuk D, Curtis L, Scheff P, Chung J, Rizzo M, Lewis C, Keys N, Moomey M, 2001. Bioaerosol emissions from a suburban yard waste composting facility, *Ann. Agric. Environ. Med*, 8 : 177-185.
- Hugues M. et Steele T, 1994. Occurrence and distribution of *Legionella* species in composted plant materials. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (6) : 2003-2005.

IFEN, 2004. Les données de l'environnement, N°98, d décembre 2004.
<http://www.ifen.fr/publications/DE/PDF/de98.pdf>

INRS, 2007. Listes des appareils de prétraitement validés par le conseil supérieur d'hygiène publique de France. Complément de la brochure INRS ED 918. / [http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/inrs01_search_view_view/6D055E66DC875133C1256ECB004F42FD/\\$FILE/ed918bis.pdf](http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/inrs01_search_view_view/6D055E66DC875133C1256ECB004F42FD/$FILE/ed918bis.pdf)

Jarraud S. et Freney J., 2006. *Legionella* ; Monographie de microbiologie. Ed. Lavoisier TEC & DOC, 11, rue Lavoisier 75384 Paris Cedex 08, 192 pp.

Karra S. et Katsivela E., 2007. Microorganisms in bioaerosol emissions from wastewater treatment plants during summer at a Mediterranean site. *Water Res.*, 41 (6) : 1355-1365.

Kiviranta H, Tuonaimen A, Laitinen S, Nevalainen A, Liesivuori J, 1999. Exposure to airborne microorganisms and volatil organic compounds in different types of waste handling. *Ann. Agric. Environ. Med*, 6 : 39-44.

Krajewski J, Cyprowski M, Szymczak W, Gruchala J, 2004. Health complaints from workplace exposure to bioaerosols : a questionnaire study in sewage workers, *Ann Agric Environ Med*, 11 : 199-204.

Lavoie J, Bourdouxhe M, Guertin S, 2004. Etude des agents biologiques et des contraintes ergonomiques lors de l'utilisation de camions avec bras assisté pour la collecte des ordures domestiques, *recherche*, 6 (1) : 1-23. <http://www.irsst.qc.ca/files/documents/PubIRSST/R-317.pdf>

Lewis D., Gattie D., Novak M., Sanchez S., Pumphrey C., 2002. Interactions of pathogens and irritant chemicals in land-applied sewage sludges (Biosolids), *BMC Public Health*, 2 (11) : 1-8.

Lowry P. et Tompkins L., 1993. Nosocomial Legionellosis : a review of pulmonary and extrapulmonary syndromes. *Am. J. Infect. Control.*, 21 (1) : 21-27.

Marston B., Plouffe J., File T., Hackban B., Salstrom S, Lipman H., Kolczak M., Breiman R., 1997. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance study in Ohio. The Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. *Arch. Intern. Med.* 157(15) :1709-1718.

Messi P., Guerrieri E., Bondi M., 2003. Bacteriocin-like substance (BLS) production in *aeromonas hydrophila* water isolates. *FEMS Microbiol. Lett.*, 220 : 121-125.

Molmeret M., 2001. Réplication intracellulaire de *Legionella pneumophila* : des amibes aux macrophages, Thèse d'Université, pp 156.

Morris G., Steigerwalt A., Feeley J., Wong E., Martin W., Patton C., Brenner D., 1980. *Legionella gormanii* sp. nov., *J Clin Microbiol.*, 12 (5) : 718-721.

Murga R., Forster T., Brown E., Pruckler J., Fields B., Donlan R., 2001. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology*, 147 (Pt 11) : 3121-3126.

Mustin, M. 1987. Le compost, Gestion de la matière organique. Édition François Dubusc. Paris. pp. 954.

Navarrot J-C., 2003. Prévention des légionelloses / réglementation et sensibilité des *Legionella* aux biocides, Thèse d'exercice, Université Claude Bernard - LYON 1. pp 125.

NCBI, 2007. Page ressources Internet : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>
Consultation de ressources le 04 avril 2007. :
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=445&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Nguyen TM, Illef D, Jarraud S, Rouil L, Campese C, Che D, Haeghebaert S, Ganiayre F, Marcel F, Etienne J, Desenclos JC., 2006. A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers--how far can contaminated aerosols spread?, *J Infect Dis.*, 193 (1) :102-111.

Noël L., Carre J., Legeas M., 2002. Eléments pour la prise en compte des effets des unités de compostage de déchets sur la santé des populations riveraines, RAPPORT D'ETUDE de l'ENSP, pp 34.

Ohno A., Kato N., Yamada K., Yamaguchi K., 2003. Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl Environ Microbiol*, 69 : 2540-2547.

Ortiz-Roque C. et Hazen T, 1987. Abundance and Distribution of *Legionellaceae* in Puerto Rican Waters. *Appl Environ Microbiol.*, 53 (9) : 2231-2236.

Palmer C., Tsai Y-L., Paszko-Kolva C., Mayer C., Sangermano L., 1993. Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods, *Appl Environ Microbiol*, 59 (11) : 3618-3624.

Palmer C., Bonilla G., Roll B., Paszko-Kolva C., Sangermano L., Fujioka R., 1995. Detection of *Legionella* species in reclaimed water and air with the EnviroAmp *Legionella* PCR Kit and direct fluorescent antibody staining. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (2) : 407-412.

Pascual L., Perez-Luz S., Amo A., Moreno C., Apraiz D., Catalan V., 2001. Detection of *Legionella pneumophila* in bioaerosols by polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.*, 47 (4) : 341-347.

Pope D., Soracco R., Gill H, Fliermans C., 1982. Growth of *Legionella pneumophila* in two-membered cultures with green algae and *cyanobacteria*. *Cur. Microbiol.*, 7 : 319-322.

Prazmo Z, Krysinska-Traczyk E, Skorska C, Cholewa G, Dutkiewicz J, 2003. Exposure to bioaerosols in a municipal sewage treatment plant. *Ann. Agric. Environ. Med*, 10 : 241-248.

RECORD, 2003. Etat des connaissances sur les microorganismes dans la filière déchets, 124 pp, n°01-0657/1A.

Reeves M., Pine L., Hutner S., George R., Harrell K., 1981. Metal requirements of *Legionella pneumophila*, *J Clin microbiol.*, 13(4) : 688-695.

Rogers J. et Keevil C., 1992. Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl Environ Microbiol.*, 58 (7) : 2326-2330.

Rogers J., Dowsett A., Dennis P., Lee J., Keevil C., 1994. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl Environ Microbiol.*, 60 (5) :1585-1592.

Roig J., Domingo C., Morera J., 1994. Legionnaires' disease. *Chest.*, 105 (6) : 1817-1825.

Rowbotham, T., 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 33 : 1179-1183.

Rowbotham T., 1986. Current views on the relationships between *amoebae*, *Legionellae* and man. *Isr J. Med. Sci.*, 22 (9) : 678-89.

Rylander R, 1999. Health effects among workers in sewage treatment. *Occup. Environ. Med*, 56 : 354-357.

Solomon JM, Rupper A, Cardelli JA, Isberg RR, 2000. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Infect Immun.*; 68 (5) : 2939-2947.

- Stampi, S., F. Zanetti, A. Crestani, and G. De Luca. 2000. Occurrence and seasonal variation of airborne gram negative bacteria in a sewage treatment plant. *New Microbiol.*, 23 : 97-104.
- States S., Conley L., Ceraso M., Stephenson T., Wolford R., Wadowsky R., McNamara A., Yee R., 1985. Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. *Appl Environ Microbiol.*, 50 (5) :1149-1154.
- Steele T., 1989. Legionnaires' disease in South Australia, 1979-1988. *Med. J. Aust.*, 151 (6) : 322-328.
- Steele T., Lanser J., Sngster N., 1990. Isolation of *Legionella longbeache* serogroup 1 from potting mixes, *Appl Environ microbiol*, 56 (1) : 49-53.
- Steele T. et McLennan A., 1996. Infection of *Tetrahymena pyriformis* by *Legionella longbeachae* and other *Legionella species* found in potting mixes, *Appl Environ Microbiol*, 62 (3) : 1081-1083.
- Stout J., Yu V., Best M., 1985. Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Appl Environ Microbiol.*, 49 (1) : 221-228.
- Stout J., Best M., Yu V., Rihs J., 1986. A note on symbiosis of *Legionella pneumophila* and *Tatlockia micdadei* with human respiratory flora. *J Appl Bacteriol.*, 60 (4) : 297-299.
- Tatlock, 1944. A Rickettsia-like organism recovered from guinea pigs, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 57 : 95-99.
- Tissot B., 2004. Sécurité sanitaire et gestion des déchets : quels liens ?, Rapport de l'Académie des sciences, Ed. Lavoisier, ISBN 2-7430-0727-3, 188 pp.
- Tison D., Pope D., Cherry W., Fliermans C., 1980. Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (*cyanobacteria*). *Appl Environ Microbiol.*, 39 (2) :456-459.
- Thorn J., 2001. Seasonal variations in exposure to microbial cell wall components among household waste collectors, *Ann. Occup. Hyg*, 45 (2) : 153-156.
- Thorn J., Beijer L., Jonsson T., Rylander R., 2002. Measurement strategies for the determination of airborne bacterial endotoxin in sewage treatment plants, *Ann. Occup. Hyg*, 46 (6) : 549-554.
- Thorn J., Beijer L., 2004. Work-related symptoms and inflammation among sewage plant operatives, *Int J. Occup. Environ. Health*, 10 : 84-89.
- Wadowsky R., Yee R., 1983. Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental isolate of *Flavobacterium breve*. *Appl Environ Microbiol.*, 46 (6) : 1447-1449.
- Wadowsky R., Wolford R., McNamara A., Yee R., 1985. Effect of Temperature, pH, and Oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water. *Appl Environ Microbiol.*, 49 (5) : 1197-1205.
- Wallis L, Robinson P., 2005. Soil as a source of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (Lp1), *Aust N Z J Public Health.*, 29 (6) : 518-520.
- Winn W., 1988. Legionnaires disease: Historical Perspective. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1 (1) : 60-81.
- Wouters I., Douwes J., Doekes G., Thorne P., Brunekreef B., Heederick D., 2000. Increased levels of markers of microbial exposure in homes with indoor storage of organic household waste, *Appl Environ Microbiol*, 66 (2) : 627-631.
- Wouters I., Hilhorst S., Kleppe P., Doekes G., Douwes J., Peretz C., Heederik D., 2002. Upper airway inflammation and respiratory symptoms in domestic waste collector, *Occup. Environ. Med.*, 59 : 106-112.