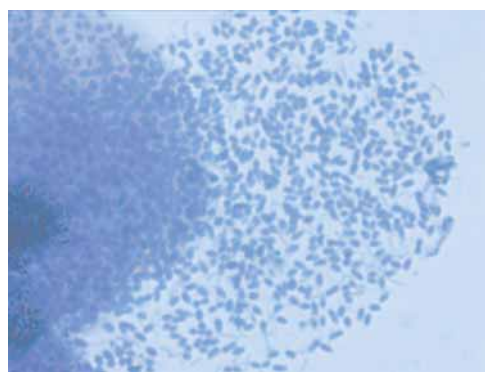


GESTION DES RISQUES MICROBIOLOGIQUES LIÉS À L'ENVIRONNEMENT

*Actes de la Journée Ecrin
de l'environnement
du 5 mai 2004*



OBJECTIFS

L'association Ecrin, créée en 1990 par le CNRS et le CEA, favorise les relations entre les laboratoires de recherche et l'industrie pour optimiser le transfert de technologies et réfléchir, dans un cadre multidisciplinaire, à des innovations permettant de créer de la richesse et des emplois. L'intérêt d'Ecrin est d'être un lieu neutre où des experts et des décideurs de différentes disciplines et de toutes origines peuvent travailler librement sur des sujets d'intérêt commun préalablement définis. Des chercheurs du public ou du privé, des représentants de groupes industriels, de PME ou de ministères peuvent ainsi étudier des sujets émergents qui contribueront à l'économie de demain. Pour les sujets technologiques, on aborde la prospective, l'économie, l'impact sur l'environnement et la santé et, s'il y a lieu, les problèmes d'acceptabilité par la société.

THÉMATIQUES

Les thématiques abordées au sein d'Ecrin résultent de la demande externe de nos adhérents et dépendent des compétences existantes dans l'association. Elles sont à ce jour les suivantes :

- Agroalimentaire
- Biologie, biotechnologies, et santé
- Économie et stratégie
- Énergie
- Environnement
- Matériaux
- Optoélectronique
- Organisation et société
- Risques
- Technologies pour l'information et la communication

FONCTIONNEMENT

Les Clubs et les Actions sont à la base du fonctionnement d'Ecrin. Les Clubs travaillent sur une problématique qui intéresse plusieurs adhérents. Les Actions sont, au contraire, commandées et financées par un partenaire externe. Tous les participants contribuent et profitent de l'ensemble des travaux d'un Club. Il y a mutualisation des connaissances et des besoins au travers d'un travail coopératif.

Un Club est organisé en projets et groupes de travail. Un projet travaille sur un objectif bien défini pendant une durée déterminée. Un groupe de travail a une continuité dans le temps. Il peut servir de préparation à un projet qu'il convient de définir, faire de la veille scientifique et technique, etc.

Les Clubs sont animés conjointement par un chargé de mission d'Ecrin et un président choisi pour ses compétences et reconnu dans le domaine dont il a la responsabilité. Avec un bureau, constitué d'experts permettant de couvrir l'ensemble de la thématique, le Club définit une stratégie, propose et lance des projets et des groupes de travail. Il suit l'avancement des projets et s'assure qu'ils progressent bien.

Il existe une grande latitude quant à l'utilisation des travaux des Clubs. Cela dépend du sujet et de son positionnement dans le contexte national et international. Les débats et résultats peuvent rester strictement confidentiels, si les participants le souhaitent, ou être publiés en totalité ou en partie pour faire profiter la communauté externe des réflexions menées à Ecrin. Lorsque des résultats sont publiés dans des revues ou des livres, l'objectif est souvent de rendre accessible au plus grand nombre des sujets difficiles ou des réflexions multidisciplinaires. Les livres sont publiés chez des éditeurs qui en assurent une large diffusion et permettent ainsi un impact important.

Lorsque suffisamment de résultats ont été obtenus, ou lorsqu'un projet est terminé, Ecrin organise des conférences plénières, ouvertes à tous, présentant une synthèse du sujet étudié. À l'inverse, des réunions plénières et des colloques permettent d'ouvrir des thématiques.

DES OFFRES ADAPTÉES À LA DEMANDE

L'objectif principal d'Ecrin est d'accroître l'efficacité de la chaîne allant de la recherche aux applications. Le transfert est de moins en moins linéaire. Le travail en réseau et l'interconnexion d'activités transversales est maintenant un facteur important pour l'innovation, et correspond au cœur du métier d'Ecrin, qui consiste à mettre en relation et à faire travailler des interlocuteurs de milieux différents.

Ecrin cherche à répondre aux préoccupations du plus grand nombre d'adhérents. Ceux-ci ont des origines très diverses (organismes de recherche, groupes industriels, PME, ministères...) et des objectifs différents. Leur mise en relation, dans un lieu neutre, permet des synergies profitables à tous, mais il faut prendre en compte leurs objectifs particuliers dans le travail qui est mené au sein d'Ecrin pour les satisfaire au mieux.

Pour les laboratoires, il s'agit de les aider à mieux valoriser leurs recherches en trouvant l'industriel susceptible d'exploiter leurs résultats, moyennant éventuellement des développements complémentaires.

Pour le grand groupe, il s'agit de lui offrir des opportunités qu'il n'a pas dans sa structure de recherche et développement déjà très complète : travail dans un lieu neutre, mise en liaison avec des PME, ouverture vers des laboratoires étrangers...

Les PME ont fait l'objet d'un effort particulier en 2004 avec la création de la Mission PME. En effet, ces entreprises sont très nombreuses sur le territoire national et ne disposent pas de moyens de recherche aussi puissants que ceux des grands groupes industriels. Or, la recherche et l'innovation jouent un rôle clef dans leur développement économique. Ecrin permet de les mettre en contact avec les laboratoires pertinents pour acquérir un avantage significatif sur le marché. Il peut aussi, notamment dans le cadre des Clubs, leur permettre d'accroître leurs marchés ou d'en ouvrir de nouveaux.

Les représentants des ministères trouvent dans Ecrin un lieu de synthèse et de discussions sur des sujets qui sont ou seront au cœur de notre société comme de notre économie. Les Clubs permettent de faire émerger les signaux faibles et de mieux anticiper l'avenir ; d'aider à choisir les bonnes priorités ; d'avoir des éléments pour élaborer les réglementations ou normes futures...

LES RÉGIONS, L'EUROPE ET L'INTERNATIONAL

Ecrin a des partenariats privilégiés en région mais aussi quatre structures dédiées : Ecrin - Bretagne, Ecrin - Pays-de-la-Loire, Ecrin - Rhône-Alpes et Ecrin - Midi-Pyrénées. Ces structures sont à l'écoute des régions pour travailler, dans le cadre de leurs compétences, sur des sujets spécifiques à celles-ci.

Au niveau de l'Europe, Ecrin participe, comme partenaire, à l'élaboration de projets européens. Ainsi, en 2004, deux projets ont été acceptés sur quatre présentés. Par ailleurs, Ecrin commence à impliquer des experts étrangers dans ses Clubs, en tenant compte bien sûr des intérêts économiques des adhérents. L'objectif est de créer un réseau européen utile aux groupes industriels, aux PME, aux laboratoires et organismes de recherche.

Grâce à son réseau, Ecrin a lancé, hors Europe, des initiatives dans quelques pays avec deux objectifs. Le premier est de donner des possibilités supplémentaires à des laboratoires français de recherche appliquée, en les associant à des laboratoires étrangers ayant des spécialités complémentaires. Le second est d'aider nos industriels adhérents (grands groupes et PME) à renforcer leur activité économique à l'étranger.

PRÉSENTATION DE LA JOURNÉE

Si les infections d'origine hydrique ne représentent plus qu'un bruit de fond plus ou moins cerné dans notre pays industrialisé, l'actualité nous montre que la menace due aux micro-organismes pathogènes, qui circulent dans notre environnement, pour la santé des populations, est omniprésente. Mais pour estimer et ensuite gérer le risque infectieux les questions se renouvellent avec les évolutions des micro-organismes eux-mêmes ainsi que des modes de vie.

Cette journée avait pour objet de faire un point et de débattre ensuite de quelques questions d'actualité comme :

- l'antibiorésistance constatée de certains germes et des conséquences à en tirer pour nos stratégies de prévention ou nos protocoles de soins,
- les apports de la biologie moléculaire pour la détection et l'identification des micro-organismes,
- les stratégies de maîtrise des risques infectieux liés aux évolutions technologiques, que ces évolutions concernent l'habitat, l'alimentation ou plus généralement notre environnement.

Toutes les interventions ont mentionné l'importance de l'approche écologique. La chaîne trophique est impliquée dans la transmission de la « résistance ». Les concepts de développement durable, de principe de prévention et de précaution doivent trouver dans la gestion des risques microbiens leur traduction concrète. Le rôle de l'épidémiologie est central dans les risques infectieux. La surveillance implique de progresser en permanence dans la détection et la caractérisation des « agents ». La valorisation de l'étude des relations santé / environnement est un élément central qui permet le développement des connaissances, la capacité d'expertise et les actions et gestion à mettre en œuvre.

Chaque atelier a ensuite permis d'ouvrir le débat sur des aspects complémentaires de la gestion des risques microbiens. Le premier atelier a mis l'accent sur les questions liées à l'élevage, l'eau, les pollutions résiduelles et les flux de gènes de résistance. Il a dégagé des thématiques à étudier, plus particulièrement comme les faibles concentrations sur les bactéries, les transferts de gènes *in situ* ou encore l'impact des désinfectants. À noter que les animaux consomment à peu près autant d'antibiotiques que les humains, mais ce ne sont pas les mêmes.

Le deuxième atelier a montré que nous disposions d'outils et de méthodes, mais qu'on est toujours dans les faibles doses dans l'environnement. Pour l'urgence et le contrôle, le plus important est l'analyse dans les domaines de l'eau et de l'agroalimentaire. Il y a des demandes en analyses de l'air et en microbiologie du sol. Il a insisté sur l'importance de la préparation des échantillons, le besoin de réponses rapides à moindre coût.

Le dernier atelier a abordé principalement le risque des légionelles et amibes associées aux tours de réfrigération. Les expertises réalisées dans le Nord-Pas de Calais ont mis en évidence toutes les difficultés d'une démarche liée à des indicateurs pas toujours adaptés, à un manque de formation, à l'efficacité des traitements *in situ*, aux contraintes d'exploitation, aux choix des lieux de prélèvements, à la variabilité des résultats... Dans tous les cas, la connaissance des écosystèmes est indispensable.

Date de publication : mars 2005 - © Ecrin

Crédits photos couverture :
© CIRSEE

SOMMAIRE

INTRODUCTION

René Seux, École nationale de la santé publique

9

CONFÉRENCES

Chairman : René Seux

QUEL RÔLE POUR L'ÉPIDÉMIOLOGIE DANS LA MAÎTRISE DES RISQUES D'ORIGINE MICROBIOLOGIQUE

Jean-Claude Desenclos, Institut national de veille sanitaire

19

L'ÉVOLUTION DE LA RÉSISTANCE DES BACTÉRIES AUX ANTIBIOTIQUES EST UN PHÉNOMÈNE ÉCOLOGIQUE

Antoine Andreumont, Hôpital Bichat, Paris

27

ÉVOLUTION DES RISQUES SANITAIRES ASSOCIÉS AUX PROTOZOAIRES

Francis Derouin, Faculté de médecine, hôpital Saint-Louis, Paris

29

LA VIROLOGIE DES EAUX - COMPLEXITÉ DE L'APPROCHE ET ENJEUX SANITAIRES

Christophe Gantzer, Faculté de pharmacie de Nancy I

35

ATELIERS

Atelier 1

LE RÔLE DE L'ENVIRONNEMENT ET DES MODES D'ÉLEVAGE DANS LA DISSÉMINATION DE L'ANTIBIORÉSISTANCE (QUELLE ÉVOLUTION DU POTENTIEL IMMUNITAIRE DE LA POPULATION...)

Arlette Laval, École nationale vétérinaire de Nantes I
Jean Lesne, École nationale de la santé publique

41

Atelier 2

**INTÉRÊT DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET
DES BIOTECHNOLOGIES POUR LA DÉTECTION ET
LE DÉNOMBREMENT RAPIDE DES MICRO-ORGANISMES**

Yves Levi, Université de Paris XI

49

Atelier 3

**COMMENT ASSURER LA MAÎTRISE DES RISQUES ASSOCIÉS AUX
MICRO-ORGANISMES QUI SE DÉVELOPPENT DANS LES EAUX CHAUDES ?**

Micro-organismes aquatiques thermophiles

Évaluation du risque lié à *Legionella pneumophila*

Philippe Hartemann, Faculté de médecine de Nancy I

55

Épidémie de légionellose du Nord Pas de Calais

Mission nationale d'appui

Gestion du risque sur les circuits de refroidissement : quels constats

Michèle Merchat, Climespace

56

**Synthèse de l'atelier : comment assurer la maîtrise des risques associés
aux micro-organismes qui se développent dans les eaux chaudes ?**

France Wallet, EDF-GDF

58

LISTE DES PARTICIPANTS

65

INTRODUCTION

René Seux

École nationale de la santé publique

Les conséquences de la circulation de microorganismes pathogènes dans notre environnement ont largement été atténuées depuis le milieu du XIX^e siècle. Cela est dû à l'accroissement des connaissances sur les microorganismes, à l'identification des différents modes de contamination et à l'établissement de règles d'hygiène dont les principes fondateurs solidement posés, au début du XX^e siècle ont résisté à l'épreuve des années. Mais la vaccination et l'usage des antibiotiques ont apporté un concours efficace aussi bien sur le plan préventif que curatif.

Avec cet arsenal, les hygiénistes ont pu penser au début de la seconde moitié du XX^e siècle que les épidémies d'origine hydrique ou alimentaire appartenaient au passé dans nos pays industrialisés. Il fallait alors faire face aux nouveaux dangers liés à la diffusion des substances chimiques nouvelles, largement utilisées dans tous les secteurs d'activité : agricole, production industrielle, santé, etc, et affronter avec ces nouveaux dangers le risque à long terme. C'est ainsi qu'est née la démarche d'évaluation des risques avec, en France, des développements particuliers liés au choix de l'énergie nucléaire.

Mais l'actualité depuis une vingtaine d'années ne manque pas de nous rappeler que les microorganismes évoluent et l'histoire des maladies infectieuses ne s'arrête pas avec les grandes découvertes des XIX^e et XX^e siècles.

Pour faire le point sur le risque microbiologique d'origine environnementale, le club Environnement et société a organisé une journée de réflexion dans les locaux du CNRS (rue Michel Ange - Paris 16^e) le 5 mai 2004.

Nous résumons ici l'essentiel de cette journée dont le contenu s'est révélé riche et particulièrement intéressant.

APPORT DE L'ÉPIDÉMIOLOGIE POUR L'ÉVALUATION ET LA GESTION DES RISQUES INFECTIEUX

En ouvrant le cycle des conférences introductives, **Jean-Claude Desenclos**, responsable du département des maladies infectieuses de l'INVS (Institut national de veille sanitaire) a rappelé à l'auditoire le cadre d'analyse

qu'utilisent aujourd'hui les équipes spécialisées dans l'évaluation des risques appliqués aux maladies infectieuses en vue de leur maîtrise et de leur gestion. Il a, sur la base de quelques exemples d'actualité, montré que l'approche méthodologique prend en considération le triptyque, agent, hôte, environnement selon le schéma de la figure 1.

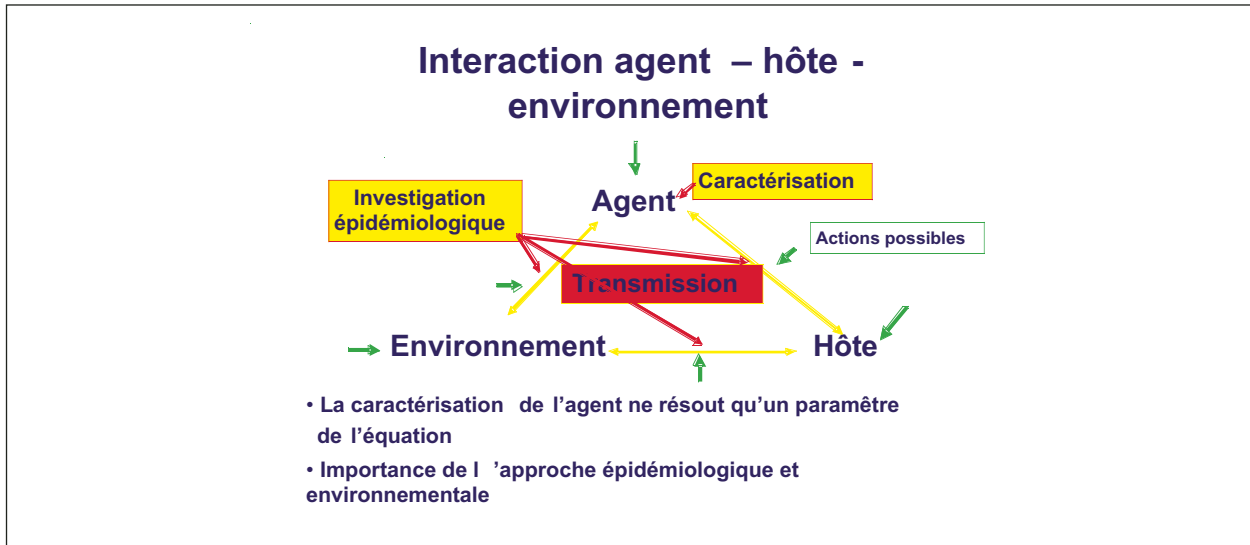


Figure 1 : Interaction agent, hôte, environnement.

Pour aborder la gestion du risque infectieux, les éléments à prendre en considération sont nombreux.

Ils concernent :

- L'agent : caractéristiques biologiques, dose infectante, résistance.
- Le ou les réservoirs : humain, animal, environnemental, etc.
- Les modes de transmission.
- La durée d'incubation.
- La durée d'infectiosité.
- Les manifestations pathologiques, gravité, létalité, séquelles.
- Les moyens de prévention et thérapeutiques, etc.

Il a en particulier montré l'efficacité de la démarche en décrivant l'épisode des cas de SRAS à l'hôpital français de Hanoï au Vietnam en février-mars 2003. Mais il a aussi discuté les difficultés auxquelles se heurtent les enquêtes épidémiologiques et environnementales avec l'épidémie de légionelloses dans le Pas-de-Calais de novembre 2003 à janvier 2004.

Cette conférence a fait ressortir les points essentiels suivants :

- l'épidémiologie est au centre de l'évaluation des risques infectieux en complémentarité de la microbiologie et de l'approche environnementale,
- la maîtrise des risques repose sur la puissance de la recherche et l'importance des moyens de veille et de surveillance qui conditionnent l'excellence de l'expertise,
- dans le domaine de l'infectiosité il faut tout faire pour pouvoir agir sur la base du principe de prévention.

Les conférences suivantes ont été consacrées à deux catégories d'agent infectieux (virus et protozoaires) et à l'importante question de l'antibiorésistance.

COMPLEXITÉ DE L'APPROCHE ET DES ENJEUX SANITAIRES LIÉS AUX VIRUS DANS LES EAUX

Dans un exposé très complet **Christophe Gantzer** (faculté de pharmacie-Nancy) a décrit la complexité de la virologie des eaux et des enjeux sanitaires qui lui sont liés.

Plus de 150 sérotypes de virus entériques pathogènes pour l'homme ont été identifiés à ce jour. Ils sont excrétés en grandes quantités dans les selles des individus infectés (10^3 à 10^{10} particules virales par g de selle). Ceci illustre la dangerosité des contaminations fécales de l'eau, l'importance de l'assainissement et plus généralement de l'hygiène. Les pathologies sont très variées :

- gastro entérites avec les Norovirus, Rotavirus, Adénovirus, etc,
- hépatites avec les virus de l'hépatite A et E,
- méningite, atteinte cardiaque, paralysie avec les Entérovirus (Coxsackievirus, A et B, Ecovirus, Poliovirus...).

Ces virus nus de 20 à 80 nm peuvent être transmis par voie féca-orale directement ou par l'intermédiaire de la contamination de l'eau et des aliments. Les Norovirus seraient à eux seuls responsables de plus de 85% des épidémies de gastro-entérites d'origine non bactérienne. Selon *Mead et al.*, ils auraient pour conséquences : 50 000 hospitalisations et 300 décès chaque année aux USA. Fruits de mer élevés dans des zones polluées, défaillance du traitement des eaux d'alimentation, incident sur le réseau de distribution, baignade dans des eaux contaminées par des effluents sont autant de causes identifiées de ces épidémies d'origine virale. (*Koopmans et al. 2002 - Koopmans and Druzer 2004*).

Mais il faut souligner que l'estimation de l'incidence des maladies virales d'origine hydrique ou alimentaire reste

problématique car il n'est pas facile d'identifier les personnes infectées et le support (ou le vecteur) de la contamination.

En ce qui concerne l'eau des réseaux publics, il est aujourd'hui bien établi que les bactéries fécales qui sont utilisées comme indicateurs de l'efficacité des traitements de désinfection ne reflètent pas le comportement des virus. Mais la complexité de la recherche des virus dans les eaux ne permet pas d'envisager en l'état actuel des connaissances une analyse systématique par culture de cellules dans le cadre des contrôles sanitaires.

Les techniques d'amplification génétiques de type (RT)-PCR sont sensibles, rapides et adaptées à tous les sérotypes mais elles ne permettent pas de juger du caractère infectieux des virus.

Ceci montre qu'en l'état actuel des connaissances on ne peut pas relier la détection de génome viral à la présence de virus infectieux correspondant. Par contre, la présence de génome viral peut être considérée comme un indicateur d'une pollution viral plus ou moins ancienne. Des études fondamentales concernant les mécanismes de dégradation d'une particule virale (capside et génome) sont cependant nécessaires pour évaluer la qualité d'un tel indicateur.

À l'inverse, l'absence de génome viral est relativement informative puisqu'elle est synonyme d'absence de virus infectieux. La biologie moléculaire permet en outre une recherche rapide du virus et constitue donc un outil puissant d'investigation sur l'origine des épidémies.

RISQUES LIÉS AUX PROTOZOAIRES

Le Pr. **Francis Derouin** (laboratoire de parasitologie-mycologie - Paris) a rappelé que ces dernières années plusieurs éléments ont mis en perspective les risques sanitaires liés aux protozoaires avec :

- La survenue d'épidémies de grande ampleur liée à des contaminations de l'eau destinée à la consommation humaine. Milwaukee en 1993 et avec une moindre ampleur Dracy le Fort en 2001 et Divonnes les Bains en 2003 pour prendre des exemples en France.
- L'épidémie de SIDA est le révélateur du caractère opportuniste de plusieurs protozoaires tels que *Cryptosporidium*, *Toxoplasma gondii*.
- L'apparition de nouveaux pathogènes, souvent révélés chez les malades immunodéprimés mais dont l'importance dans la population générale reste encore mal définie : microsporidies, *Cyclospora*.
- Le développement de nouveaux outils analytiques permettant l'identification spécifique des parasites chez l'homme et dans l'environnement.

La démarche utilisée pour évaluer le risque chimique a été appliquée pour mieux définir ces risques parasitaires, mais à l'heure actuelle le seul modèle validé en

parasitologie est celui de *Cryptosporidium* appliqué au risque lié à la consommation d'eau.

Ce modèle développé par l'Afssa en 2002 représente un outil de gestion applicable à l'évaluation du risque associé à une ressource sensible mais aussi à l'évaluation du risque en cas de contamination accidentelle.

En raison des limites de la chimioprophylaxie, les mesures individuelles de prévention des protozooses digestives portent avant tout sur l'hygiène alimentaire et corporelle.

Cependant, l'efficacité des mesures de prévention reste difficile à évaluer en l'absence de marqueurs fiables permettant de mesurer l'incidence et la prévalence des infections parasitaires.

La prévention collective regroupe tout un ensemble de mesures destinées à réduire le risque parasitaire pour la population.

Dans ce domaine, l'analyse quantitative du risque peut être considérée comme un bon outil de gestion et d'aide à la décision. Mais on constate que les données sur la contamination environnementale des denrées alimentaires restent très insuffisantes, de même que les données sur l'incidence et la prévalence des infections parasitaires chez l'homme et l'animal.

Un effort reste à faire pour mieux utiliser les compétences des praticiens et des biologistes avec la nécessité d'une coordination et d'une centralisation du recueil des données.

Au niveau français, comme au niveau européen, des initiatives pour la mise en place de réseaux ont été prises.

L'ÉVOLUTION DE LA RÉSISTANCE DES BACTÉRIES AUX ANTIBIOTIQUES EST UN PHÉNOMÈNE ÉCOLOGIQUE

Le Pr. **Antoine Andremont** (Hôpital Bichat - Paris) a dressé dans sa conférence la problématique générale qui a ensuite donné lieu à débat dans un atelier.

Les microorganismes produisant des antibiotiques dans la nature sont ancestraux. On ne sait pas exactement à quoi leur sert cette production en termes évolutifs. L'hypothèse la plus communément admise est que cette production leur confère un avantage écologique au sein de leurs milieux naturels qui sont constitués par les sols et les environnements biotiques animaux ou végétaux. Au cours de l'évolution un équilibre s'était établi. Il permettait la coexistence des microorganismes produisant naturellement des antibiotiques et les autres formes de vie, y compris les milliers d'autres espèces bactériennes. Cet équilibre a été brutalement rompu lorsque la production d'antibiotiques par l'homme a débuté en 1945 puis s'est accrue de façon exponentielle au cours des 50 années qui ont suivi en raison de l'extraordinaire efficacité de ces médicaments sur de nombreuses infections bactériennes dont ils

transforment le pronostic. Cela a abouti à ce que plusieurs dizaines de milliers de tonnes d'antibiotiques soient utilisées chaque année en médecine humaine et vétérinaire, en élevage et en agriculture.

Malheureusement, *in fine*, ces antibiotiques et / ou leurs métabolites actifs se retrouvent au contact des bactéries commensales et de l'environnement et y exercent une pression de sélection qui favorise l'émergence de mutants résistants et la dissémination des gènes de résistance.

Dans ces conditions, l'usage croissant des antibiotiques a été accompagné par une progression de la résistance bactérienne. Pendant trente ans cette évolution de la résistance bactérienne a été masquée par la mise sur le marché régulière par l'industrie pharmaceutique d'antibiotiques aux performances accrues. Toutefois, depuis le début des années 80 on a assisté à un assèchement de la découverte de nouveaux antibiotiques, bientôt suivi d'un désengagement massif des plus grosses firmes du domaine. Ce double mouvement contradictoire, augmentation de la résistance d'une part, diminution de la découverte d'antibiotiques d'autre part, a amené à la situation de crise que nous connaissons actuellement et qui est caractérisée par le fait que de multiples espèces pathogènes ne sont plus sensibles qu'à un seul antibiotique parmi ceux dont nous disposons pour soigner les malades. Le spectre de la survenue d'une épidémie due à une bactérie épidémique et contre laquelle nous n'aurions pas de moyens d'action n'est plus une hypothèse d'école mais peut devenir une réalité d'un jour à l'autre.

Dans cette conjoncture, nos moyens d'action sont ténus. Nous devons absolument diminuer notre consommation d'antibiotique sans pour autant priver les patients qui en ont besoin de leur extraordinaire efficacité sur les infections dues à des germes qui y sont encore sensibles.

C'est tout l'enjeu du plan d'action gouvernemental visant à préserver l'action des antibiotiques, publié en 2002 dont la manifestation la plus visible a été la campagne télévisuelle basée sur le slogan « Les antibiotiques, c'est pas automatique ». La tâche est toutefois particulièrement ardue en France car nous sommes le premier consommateur d'antibiotiques d'Europe et c'est une véritable révolution des modes de penser en infectiologie, en élevage, en agriculture, qu'il convient de mettre en place.

Parallèlement il faut évidemment stimuler la recherche et les investissements, notamment par un interfaçage efficace des ressources complémentaires des secteurs publics et privés, domaine naturel d'action de l'association Ecrin qui pourrait trouver là un champ particulièrement fertile pour le développement de son activité.

SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS DES ATELIERS

Microorganismes aquatiques thermophiles : risques liés à la *Legionella pneumophila*

Pr. Ph Hartmann et Michèle Merchat

Le réchauffement des eaux, lié aux phénomènes climatiques, conduit à s'interroger sur une éventuelle augmentation du risque infectieux dans des pays tempérés comme la France. La réflexion doit utiliser les connaissances actuelles sur le danger et les risques liés aux microorganismes thermophiles dans des pays où la température des masses d'eau est plus élevée, et dans les situations de réchauffement artificiel des eaux comme les rejets des activités produisant de l'énergie.

Le danger est lié à des bactéries pathogènes (ex. *Legionella*, *Pseudomonas*...) des protozoaires (*Naegleria*...) maintenant bien connues, mais probablement aussi à des bactéries opportunistes (*Afipia*, *Bosea*...) ou à des virus récemment décrits (minivirus) et retrouvés au sein d'amibes, souvent elles-mêmes non pathogènes. Il y a de toute évidence un grand intérêt à la co-culture d'amibes pour surveiller la qualité des eaux, puisque certains microorganismes sont plus souvent inclus dans celles-ci que planctoniques.

Ce danger doit être étudié de façon approfondie car, par exemple, *Legionella pneumophila* est beaucoup plus virulente que d'autres espèces de *Legionella*, certaines d'entre elles, sinon la majorité étant non pathogènes (« paix aux *Legionella* de bonne volonté dans les biofilms » !). *L. pneumophila* 1 est elle-même rencontrée dans plus de 85 % des infections et il y a, à l'intérieur de ce sérotype, des bactéries plus virulentes que d'autres, sans que l'on connaisse à ce moment les raisons de ces différences.

Ainsi, l'évaluation du risque doit se faire selon une démarche scientifique classique et non de façon empirique comme cela a été le cas jusqu'à maintenant. Les réglementations et les contrôles devront prendre en compte ces différences liées au danger et non être fixés pour un genre en général. Par exemple, l'évaluation du risque lié à une tour aëroréfrigérante conduira à des résultats tout à fait différents selon que l'on prend comme base *Legionella pneumophila* 1 ou une *Legionella* non pathogène. Or, la réglementation actuelle vise l'ensemble des *Legionella*, et peut conduire à « l'éradication » de « braves légionelles » qui pourraient être un facteur protecteur contre la colonisation par d'autres plus dangereuses !

Au plan opérationnel, l'exemple de l'épidémie de légionellose du Nord-Pas-de-Calais a montré que :

- l'arrêt préfectoral de 1999 était respecté dans ses termes,

- le guide de bonnes pratiques publié par les ministères était connu,
- le carnet de suivi était conforme aux prescriptions,
- les propriétaires de circuits de refroidissements par voie humide, ou les exploitants, avaient un contrat de partenariat avec une société de traitement d'eau, et dans certains cas, le constructeur des tours faisait des contrôles réguliers,
- un prélèvement pour analyse de légionelles était réalisé au moins une fois par an ou parfois une par trimestre.

Néanmoins, l'observation attentive de différents systèmes de refroidissement et des conditions mises en œuvre pour gérer le risque a permis de faire quelques constats étonnants qui permettent de mieux identifier les axes de progrès qui restent à définir.

Le personnel exploitant et les propriétaires de circuit de refroidissement manquent de connaissance et de compréhension sur les mécanismes conduisant à la prolifération des éléments biologiques dans les installations, notamment sur la formation de biofilm. La prise en compte efficace du risque dépend directement de cette connaissance.

D'ailleurs, malgré la connaissance du guide de bonne pratique (lecture trop rapide peut-être), des défauts clairement identifiés comme favorables à la prolifération des légionelles sont oubliés. Le risque est uniquement géré sur la base de traitements chimiques abondants et les aspects environnementaux sont négligés. Il a ainsi été constaté de très nombreuses fois des conditions favorables à la formation et à la prolifération de biofilm dont on peut trouver l'origine dans :

- une mauvaise conception avec de nombreux bras morts, aucun accès sur les tours permettant l'observation des organes internes, des matériaux dont la surface détériorée favorise la formation de dépôts biologiques,
- une mauvaise gestion du circuit avec des vitesses de circulation très faibles (régime laminaire, gestion des marches arrêts du circuit ou d'une partie du circuit).

En résumé, les propriétaires et les personnes qui exploitent ce type d'installations génératrices d'un risque pour la santé publique, doivent être formées au risque biologique.

Les traitements préventifs et curatifs ne pourront être adaptés efficacement qu'à la condition que des notions soient assimilées par l'exploitant et le propriétaire des tours, à propos :

- du comportement des microorganismes dans l'eau,
- des conditions de mise en œuvre nécessaires et en particulier la nécessité de nettoyer toutes les surfaces en contact avec l'eau dans l'installation.

La sous-traitance de ce problème n'est pas remise en cause puisqu'elle permet de s'appuyer sur des compétences spécialisées, toutefois le propriétaire d'un tel système doit vérifier que les moyens mis en œuvre sur son installation réduisent le risque au minimum et pour cela une

coordination des actions des différents intervenants est indispensable.

Au-delà de l'entretien des tours aéroréfrigérantes, des actions de recherche devraient être conduites pour mieux connaître les aérosols produits et leur trajectoire afin de réduire les risques associés aux aérosols contaminés.

Intérêt de la biologie moléculaire et des biotechnologies pour la détection et le dénombrement rapide des microorganismes

Pr. Yves Levi et Gabriel Festoc - Genesystemes

Cet atelier avait pour objectif d'examiner les perspectives nouvelles qu'offrent les méthodes issues de la biologie moléculaire et des biotechnologies.

Contraintes à prendre en considération

Les microorganismes environnementaux sont recherchés :

- pour des besoins de suivi et d'amélioration de procédés de traitement (efficacité de désinfection, activités de biodégradation ou de biotransformation, études des évolutions écologiques...),
- pour la détection précoce d'agents pathogènes ou pathogènes opportunistes,
- pour l'identification de l'origine d'épidémies,
- pour des besoins spécifiques comme la prévention des corrosions, les études scientifiques sur l'écologie bactérienne...

La rapidité d'obtention d'un résultat analytique est d'autant plus nécessaire que les microorganismes à rechercher sont susceptibles de provoquer un risque sanitaire humain et / ou vétérinaire (eau potable, aérosols pouvant contenir des légionelles, boues avant épandage, irrigation par des eaux recyclées...) ou que le résultat conditionne des réglages et le contrôle en ligne d'un procédé (eau potable, agro-alimentaire...)

La spécificité peut être indispensable pour la recherche des espèces ou des genres particuliers et moins importante pour des usages globaux comme par exemple l'évaluation d'un procédé de désinfection sur la flore totale.

La viabilité est un élément majeur puisque la réponse attendue est généralement interprétée pour connaître la capacité du (ou des) microorganismes (s) à proliférer, agir, dégrader, modifier ou infecter.

La quantification est très souvent indispensable. Dans certaines situations des méthodes dites « présence / absence » plus simples et moins coûteuses sont utilisées en alternance avec des techniques quantitatives. La limite de détection est un élément majeur lorsque la dose infectieuse est due à un très faible nombre de microorganismes.

Les interférences peuvent nuire considérablement à la qualité du résultat lorsque les microorganismes sont recherchés dans des matrices complexes (biofilms, boues, sédiments, sols...).

Conclusions de l'atelier

Les discussions ont permis d'établir un ordre de priorités pour les actions à mener afin de progresser dans la détection rapide des microorganismes tout en permettant d'obtenir des réponses fiables, précises et interprétables.

1- Améliorer et optimiser les méthodes de préparation des échantillons

Il est important de progresser pour la mise au point de méthodes de concentration couvrant la plus large gamme possible de microorganismes et permettant des rendements proches de 100%. Sans un échantillonnage rigoureux et une préparation de l'échantillon de qualité, l'analyse n'a pas lieu d'être.

2- Savoir éviter les interférences analytiques et les effets de matrice

Avec les techniques de biologie moléculaire mais aussi pour toutes les méthodes d'imagerie, les interférences conduisent à de faux résultats. Les discussions ont permis d'établir que les outils actuellement disponibles sont assez performants en conditions favorables de laboratoire mais insuffisamment fiables lorsque les échantillons sont issus de matrices complexes.

3- Favoriser le développement des nouveaux outils

Des outils existent sous forme de prototype ou de systèmes en début de commercialisation (voire pour quelques-uns commercialisés).

Mais ces systèmes ne sont accessibles qu'aux laboratoires de pointe et ne sont pas disponibles pour une utilisation de routine.

Les divers prototypes mis à l'essai n'ont jusqu'alors débouché sur aucun capteur en ligne commercialisé. Seul un analyseur en ligne en mode séquentiel est commercialisé pour la détection des coliformes dans l'eau.

4- Rendre les coûts acceptables pour les utilisateurs potentiels

Les laboratoires de microbiologie disposent souvent de moyens réduits par rapport aux unités de chimie. Il faut donc pouvoir mettre en relation l'offre et la demande. Le marché est, selon les besoins, celui d'un grand nombre de laboratoires dispersés sur le territoire national demandant des méthodes fiables et d'un coût de revient limité ou celui des laboratoires centraux ou de référence pouvant rassembler de nombreux échantillons pour un travail accompli sur des systèmes performants, mais onéreux.

5- Développer l'assurance qualité et la normalisation pour améliorer la fiabilité des mesures

De nombreuses méthodes nouvelles apparaissent dans les laboratoires mais leurs applications pour des prestations analytiques de surveillance et de contrôle nécessitent des étapes de diffusion de l'information, de normalisation et d'intercalibrations.

En résumé, les méthodes immunologiques donnent le sentiment de ne plus progresser. Les outils d'imagerie et

de biologie moléculaire sont présents et importants mais la limitation de leur usage vient des interférences dues aux matrices et à l'absence de détermination de la viabilité des microorganismes par ces méthodes.

Le rôle de l'environnement et des modes d'élevage dans la dissémination de l'antibiorésistance

Pr. Arlette Laval, ENV de Nantes et Jean Lesne, ENSP

Cet atelier s'est efforcé de faire le point sur le potentiel de dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement par les élevages, dans le double but (i) de cerner les informations manquantes pour évaluer les risques pour la santé publique résultant de ce potentiel de dissémination d'une part, et (ii) d'inviter à examiner le potentiel de conséquences négatives pour la santé publique de mesures de contrôle, qui apparaîtraient prudentes à première vue mais qui n'offriraient pas de bénéfice significatif pour la santé publique.

Les traitements collectifs d'antibiothérapie présentent un risque supérieur de diffusion de la résistance, puisque le nombre de sujets traités est supérieur.

En matière de thérapeutique et de gestion de la résistance, les monogastriques et les poissons sont considérés comme potentiellement dangereux car ils sont nombreux et émettent donc de grandes quantités de déchets dans l'environnement. L'usage des antibiotiques comme régulateurs de flore à des fins essentiellement zootechniques a contribué à noircir leur image. Leur abandon est maintenant programmé ce qui mettra fin à un long débat.

La prise de conscience du risque inhérent aux traitements vétérinaires a conduit à une réflexion globale sur les bonnes pratiques cliniques et à une évaluation du risque-bénéfice des méthodes appliquées.

Suivi des consommations et de la résistance

Dès la prise de conscience du risque que représentait l'usage massif d'antibiotiques dans l'alimentation animale à des fins zootechniques (Antibiotiques Régulateurs de Flore : ARF), des enregistrements des consommations ont été mis en place dans de nombreux pays. C'est l'Europe du Nord qui a commencé, le Danemark se dotant avec DANMAP d'un système particulièrement performant, facilité par la centralisation de la production dans ce pays. En France, des enregistrements précis sur les consommations d'antibiotiques utilisés comme médicaments sont également mis en place sous le contrôle de l'Afssa et de l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire.

Le suivi de l'antibiorésistance a été réalisé en parallèle, en particulier sur *Enterococcus faecium*, la bactérie dont la résistance à l'avoparcine, un ARF de la famille des glycopeptides proche de la vancomycine utilisée en médecine humaine, a été à l'origine des inquiétudes suscitées par

l'utilisation des antibiotiques en alimentation animale. La résistance des salmonelles, à l'origine de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) parfois très graves et celles d'*Escherichia coli*, pathogènes ou traceurs, font également l'objet d'enregistrements attentifs et de programmes de recherche.

Impact des déjections animales sur la dissémination de bactéries résistantes dans l'environnement

L'impact réel des épandages sur la dissémination de bactéries résistantes dans l'environnement est mal connu. Des travaux danois récents établissent cependant que des gènes de résistance peuvent être trouvés dans des bactéries du sol, avec une fréquence variable selon que des épandages de lisier de porcs ont été ou non récemment réalisés.

Le transfert des gènes de résistance est possible à partir des bactéries de l'environnement, mais la prévalence du phénomène est limitée.

Rôle de l'eau dans la transmission de gènes de résistance

L'eau peut être contaminée par des bactéries résistantes intestinales animales et humaines porteuses de gènes de résistance acquise, suscitant des interrogations sur les possibilités de transfert ultérieur de ces résistances aux bactéries intestinales humaines.

Un scénario pessimiste verrait des bactéries hydriques saprophytes multirésistantes franchir la barrière des traitements de production d'eau alimentaire, survivre ou se multiplier dans les réseaux de distribution, entrer dans le tube digestif humain, transférer des gènes de résistance à la flore intestinale résidente et contribuer ainsi à l'excrétion de bactéries intestinales résistantes.

La contamination des eaux de surface et des eaux de rivière par des bactéries d'origine animale est évidemment plus probable dans les zones où sont concentrés les élevages de ruminants, mais surtout de monogastriques (porcs et volailles) et plus encore peut-être de poissons. Avec ces derniers, les traitements sont en effet administrés dans l'eau et ultérieurement rejetés dans l'eau avec la flore digestive pathogène ou non ayant fait l'objet d'un contact récent et parfois massif avec des antibiotiques.

Trois remarques doivent être faites au sujet du potentiel de transfert de l'antibiorésistance acquise à l'intestin humain par les bactéries de l'eau.

La dissémination dans l'environnement de l'antibiorésistance acquise est aujourd'hui démontrée, particulièrement dans les sites riches en nutriments comme les biofilms.

Les trois mécanismes de transfert des gènes de résistance bactériens (conjugaison, transduction, et transformation) ont été étudiés *in situ* dans l'environnement aquatique et la quantification du transfert horizontal de gènes entre bactéries des environnements naturels est maintenant possible (Sorensen and al). Ces travaux permettent de penser que le transfert de plasmides dans les environnements

naturels occasionne beaucoup plus de redistribution de gènes entre bactéries taxonomiquement éloignées qu'on ne le pensait jusqu'ici.

La prévalence de l'antibiorésistance dans l'environnement ne doit pas être considérée comme le produit de la dissémination de l'antibiorésistance acquise par les bactéries contaminantes.

Il existe une antibiorésistance naturelle dans les peuplements bactériens hydriques. Des études ont mis en évidence un niveau d'antibiorésistance plus élevé chez les bactéries isolées de lacs de montagnes, de rivières et réservoirs apparemment protégés de tout impact humain ou animal, que chez les bactéries isolées de stations de traitement d'eaux usées.

Le transfert de l'antibiorésistance dans un tube digestif humain ou animal a été vérifié expérimentalement entre bactéries résidentes. Cependant, les échanges génétiques entre bactéries en transit et bactéries résidentes semblent moins probables. Les arguments s'accroissent pourtant maintenant pour soutenir l'hypothèse que les bactéries intestinales, non seulement échangent des gènes de résistance entre elles, mais peuvent aussi interagir avec les bactéries de passage dans le colon, permettant à ces bactéries d'acquiescer et de transmettre des gènes de résistance aux antibiotiques (Moulins G. et Roux S.).

Comment réduire le risque lié à l'usage des antibiotiques en élevage sur l'environnement ?

La réduction du risque commence bien sûr par la mise en place d'autres moyens que l'antibiothérapie pour contrôler les maladies infectieuses des animaux d'élevage.

L'idéal est l'éradication : lorsque les maladies disparaissent, il en va de même des besoins thérapeutiques. Cet objectif doit être privilégié. La circulation des bactéries en élevage peut être limitée par la vaccination. Elle doit l'être aussi par le respect des bonnes pratiques d'élevage. La rupture des cycles infectieux par la réduction du mélange des animaux est une mesure très efficace.

Tous les facteurs permettant de réduire les stress auxquels sont soumis les animaux sont importants : il a, en effet, été démontré que le stress peut à lui seul induire l'émergence de résistances, en l'absence de tout traitement antibiotique.

PERSPECTIVES ET VOIES DE RECHERCHE

De nombreuses questions restent sans réponse et nécessiteraient de plus amples investigations.

Les premières portent sur la signification des enquêtes de prévalence, car le sujet est si large qu'il nécessite d'être bien cadré :

- Quelles sont les sources d'émission de substances actives et de leurs métabolites ?

- Qui suit la résistance et que suit-on exactement ? De nombreuses équipes de médecins, biologistes, vétérinaires, travaillent sur le sujet, mais comment co-ordonner et synthétiser les multiples travaux qui sont produits sur ces sujets ?

Mais les interrogations qui peuvent être soulevées vont bien au-delà :

- Quel est l'impact des concentrations très faibles d'antibiotiques et de leurs métabolites actifs sur les bactéries des eaux, des boues et des biofilms ? Le rôle des supports particuliers que sont les boues et les biofilms est encore mal exploré.
- Quelle est la nature des transferts de gènes qui se produisent *in situ* dans les différents écosystèmes, entre agents pathogènes et / ou saprophytes ?
- Quel est l'impact des désinfectants et des conservateurs sur la résistance ? D'une façon plus générale, il faut s'interroger sur les interactions de divers facteurs environnementaux : stress, qu'il s'agisse du stress bactérien ou du stress des êtres vivants exposés à des bactéries résistantes, traitements physiques et chimiques des eaux et des boues qui peuvent modifier la survie des bactéries, les taux de mutation, la sélection des souches résistantes et leur capacité à échanger des informations génétiques.

L'impact de l'élevage sur la circulation de gènes de résistance dans l'environnement est important. Les pays européens ont pris la mesure du problème en restreignant les possibilités d'utilisation des anti-infectieux. Il ne faut cependant pas oublier que les résistances préexistent à tout nouvel antibiotique et que les interdictions ne protégeront jamais totalement de ce phénomène.

Références bibliographiques

Koopmans M., C-H von Bonsdorff, J. Vinjé, D. de Medici and S. Monroe (2002). Foodborne viruses. FEMS Microbiology Reviews 26, 187-205.

Koopmans M. and E. Druizer (2004). Foodborn viruses : an emerging problem. International Journal of Food Microbiology. 90 (1) 23-41.

Mead P.S., L. Slutsker, V. Dietz, J.S. Mc Caig, J.S. Bresse, C. Shapiro, P.M. Griffin and R.V. Tauxe (1999). Emerging Infectious Diseases 5 (5) 607-625.

Sorensen S.J., Sorensen A.H., Hansen L.H., Oregaard G. and Veal D. Direct detection and quantification of horizontal gene transfer by using flow cytometry and *gfp* as a reporter gene. Curr. Microbiol. 2003, 47 (2), 129-133.

Moulin G., Roux S. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2001. Rapport Afssa-ANMV, 2003.

CONFÉRENCES

Chairman : René Seux

QUEL RÔLE POUR L'ÉPIDÉMIOLOGIE DANS LA MAÎTRISE DES RISQUES D'ORIGINE MICROBIOLOGIQUE

Jean-Claude Desenclos
Institut national de veille sanitaire

Texte non disponible

Evaluation des risque appliquées au maladies infectieuses en vue de leur maîtrise et gestion

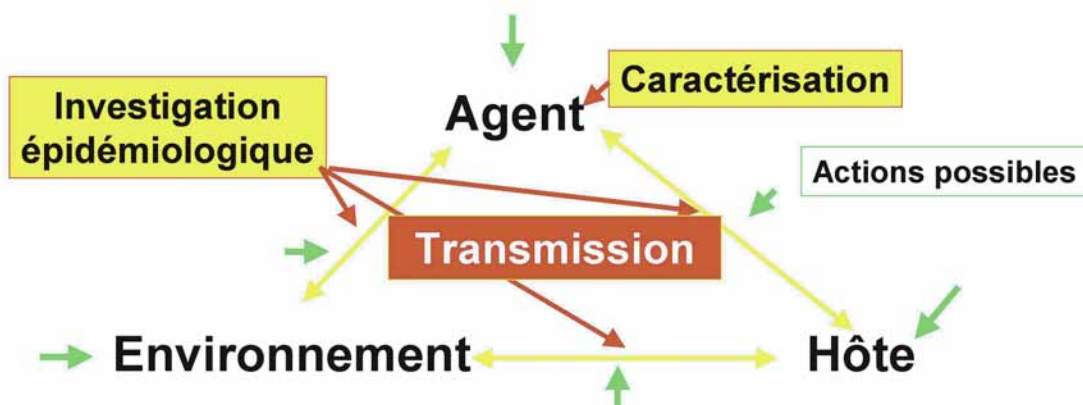
JC Desenclos
Département Maladies Infectieuses
InVS



Analyse-gestion du risque

- **Analyse du risque**
 - caractérisation du danger
 - diffusion/exposition au danger
 - dose-réponse
 - appréciation du risque
- **Gestion du risque**
 - analyse des options de gestions
 - mise en œuvre de la gestion/maîtrise du risque
- **Communication sur le risque**
- **Evaluation de l'impact**

Interaction agent – hôte - environnement



- La caractérisation de l'agent ne résout qu'un paramètre de l'équation
- Importance de l'approche épidémiologique et environnementale

Mode d'entrées

- **Par la maladie**
 - émergence: maladie inconnue (SRAS...)
 - épidémie
 - augmentation de l'incidence
 - modification des caractéristiques d'un risque connu
- **Par l'exposition**
 - source d'eau, aliment contaminés
 - exposition à un patient infectieux

Éléments à prendre en compte (1)

- **Agent/risque connu ou pas**
- **Survenue aiguë ou non**
- **Moyens de lutte/prévention disponible**
 - test de dépistage/diagnostic
 - traitement efficace
 - moyens de maîtrise de la diffusion
 - moyens de prévention efficace
- **Existence de recommandations ?**

Eléments à prendre en compte (2)

- **Agent: caractéristiques, dose infectieuse, résistance**
- **Réservoir: humain, animal, environnement, mixte**
- **Modes de transmission**
 - **Interhumain (personne à personne)**
 - **direct :**
 - contact, toucher
 - gouttelettes pharyngées
 - échange de fluides corporels: rapports sexuels
 - **indirect par un véhicule avec ou sans multiplication**
 - par l'air
 - eau, aliment
 - sang, tissus, organe
 - **indirect par un vecteur**

Eléments à prendre en compte (3)

- **Histoire de l'infection et de la maladie**
- **Manifestations, gravité, létalité, séquelles**
- **Mode d'excrétion de l'agent infectieux**
- **Durée d'incubation**
- **Durée de l'infectiosité**
- **Immunité**
 - **innée et spécifique à l'espèce (barrière d'espèce)**
 - **acquise et spécifique**
 - **de groupe**

Evaluation du risque en situation d'épidémie

- **N'est pas le fait du hasard**
 - agent
 - hôte
 - environnement
- **déséquilibre**
- **Comprendre ce qui s'est passé afin de :**
 - maîtriser (contrôler) l'épidémie
 - prévenir sa survenue ultérieure
 - améliorer les connaissances
 - "éduquer"

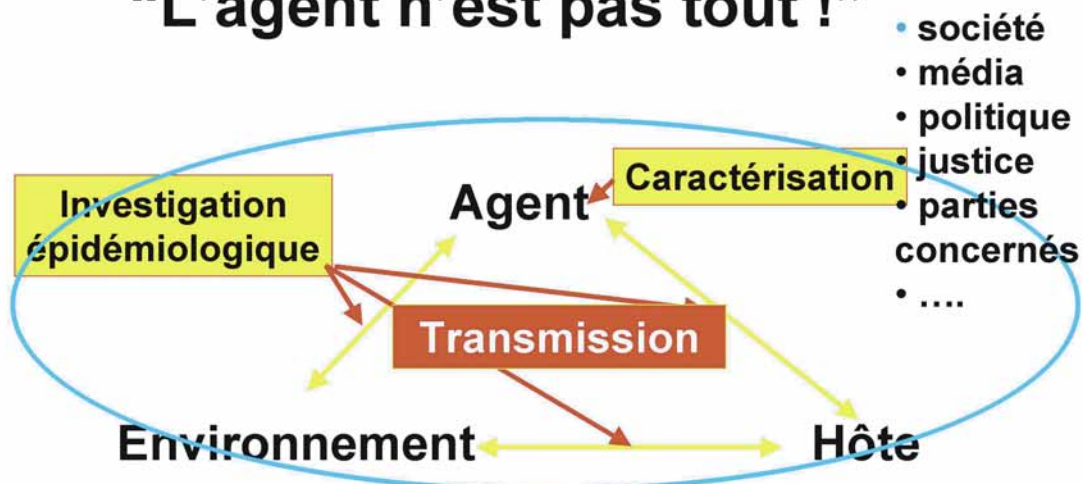
Approche par l'exposition

- **Exposition aigue à une source naturelle/délibérée**
 - eau, aliment contaminés; Cas de SRAS
 - évaluer la dose, la diffusion, le nombre d'exposés...
- **Afin de :**
 - définir au plus vite les groupes à risque
 - et cibler les mesures
 - information, retrait d'un produit
 - confinement, isolement, quarantaine
 - dépistage, traitement si maladie
 - prophylaxie, vaccination, antidote...
- **Approche analyse de risque**

Approche analyse de risque

- Transmission par un véhicule
- Approche identique au risque toxicologique
- Questions spécifiques :
 - l'agent peut se multiplier dans le véhicule
 - microbiologie prédictive (risques alimentaires)
 - effet dose réponse
- Permet d'analyser les options qui réduisent
 - au mieux le risque
 - sinon au mieux l'exposition à l'agent infectieux

“L'agent n'est pas tout !”



- La caractérisation de l'agent ne résout qu'un paramètre de l'équation
- Importance de l'approche épidémiologique
- Contexte social

Conclusion

- **Epidémiologie au centre de l'évaluation des risques infectieux**
- **Complémentarité de la microbiologie et de l'approche environnementale**
- **Importance de la surveillance, veille, anticipation, recherche et de disposer d'une excellente capacité d'expertise**
- **Science → expertise → actions/politiques**
- **Tout faire pour pouvoir agir sur la base du principe de prévention**

L'ÉVOLUTION DE LA RÉSISTANCE DES BACTÉRIES AUX ANTIBIOTIQUES EST UN PHÉNOMÈNE ÉCOLOGIQUE

Antoine Andremont
Hôpital Bichat, Paris

Lorsque Fleming découvrit le premier Pénicillium fabricant des antibiotiques, ceux-ci n'étaient pas de nouveaux arrivés dans le monde vivant. Les microorganismes produisant des antibiotiques dans la nature sont ancestraux. On ne sait pas exactement à quoi leur sert cette production en termes évolutifs. L'hypothèse la plus communément admise est que cette production leur confère un avantage écologique au sein de leurs milieux naturels qui sont constitués par les sols et les environnements biotiques animaux ou végétaux. Au cours de l'évolution un équilibre s'était établi qui permettait la coexistence des microorganismes produisant naturellement des antibiotiques et les autres formes de vie, y compris les milliers d'autres espèces bactériennes. Cet équilibre a été brutalement rompu lorsque la production d'antibiotiques par l'homme a débuté en 1945 puis s'est accrue de façon exponentielle au cours des 50 années qui ont suivi en raison de l'extraordinaire efficacité de ces médicaments sur de nombreuses infections bactériennes dont ils transforment le pronostic. Cela a abouti à ce que plusieurs dizaines de milliers de tonnes d'antibiotiques soient utilisées chaque année en médecine humaine et vétérinaire, en élevage et en agriculture. Malheureusement, *in fine*, ces antibiotiques et / ou leurs métabolites actifs se retrouvent au contact des bactéries commensales et de l'environnement et y exercent une pression de sélection qui favorise l'émergence de mutants résistants et la dissémination des gènes de résistance.

De façon schématique, on peut dire que toute prescription antibiotique quelqu'en soit la raison a deux actions. La première, bénéfique et immédiate, consiste à tuer les bactéries pathogènes qui infectent un sujet particulier à un moment donné. La deuxième, délétère et rémanente, consiste à promouvoir l'émergence et la dissémination des résistances bactériennes, soit au sein des foyers infectieux, soit surtout au sein des écosystèmes naturels. Dans ces conditions, l'accroissement de l'utilisation des antibiotiques a été accompagnée par un accroissement progressif de la résistance bactérienne. Pendant trente ans cette évolution de la résistance bactérienne a été masquée par la mise sur le marché régulière par l'industrie

pharmaceutique d'antibiotiques aux performances accrues. Toutefois, depuis le début des années 80 on a assisté à un assèchement de la découverte de nouveaux antibiotiques, bientôt suivi d'un désengagement massif des plus grosses firmes du domaine. Ce double mouvement contradictoire, augmentation de la résistance d'une part, diminution de la découverte d'antibiotiques d'autre part, a amené à la situation de crise que nous connaissons actuellement et qui est caractérisée par le fait que de multiples espèces pathogènes ne sont plus sensibles qu'à un seul antibiotique parmi ceux dont nous disposons pour soigner les malades. Le spectre de la survenue d'une épidémie due à une bactérie épidémique et contre laquelle nous n'aurions pas de moyens d'action n'est plus une hypothèse d'école mais peut devenir une réalité d'un jour à l'autre.

Dans cette conjoncture, nos moyens d'action sont ténus. Nous devons absolument diminuer notre consommation d'antibiotique sans pour autant priver les patients qui en ont besoin de leur extraordinaire efficacité sur les infections dues à des germes qui y sont encore sensibles. C'est tout l'enjeu du plan d'action gouvernemental visant à préserver l'action des antibiotiques, publié en 2002 dont la manifestation la plus visible a été la campagne télévisuelle basée sur le slogan « les antibiotiques, c'est pas automatique ». La tâche est toutefois particulièrement ardue en France car nous sommes le premier consommateur d'antibiotiques d'Europe et c'est une véritable révolution des modes de penser en infectiologie, en élevage, en agriculture, qu'il convient de mettre en place. Parallèlement il faut évidemment stimuler la recherche et les investissements, notamment par un interfaçage efficace des ressources complémentaires des secteurs publics et privés, domaine naturel d'action de l'association Ecrin qui pourrait trouver là un champ particulièrement fertile pour le développement de son activité.

ÉVOLUTION DES RISQUES SANITAIRES ASSOCIÉS AUX PROTOZOAIRES

Francis Derouin

Faculté de médecine, hôpital Saint-Louis, Paris

Hormis les protozooses à transmission vectorielle (paludisme, trypanosomiasés...) on dénombre une vingtaine de protozoaires parasites de l'homme dont l'épidémiologie (mode de contamination, transmission, diffusion) est plus ou moins directement liée aux conditions environnementales et à l'alimentation.

La plupart sont des parasitoses digestives peu, voire non pathogènes. Certaines peuvent cependant être responsables d'atteintes viscérales graves en raison d'un risque d'exacerbation et / ou dissémination viscérale, notamment chez des sujets fragilisés (enfants, patients immunodéprimés) : c'est le cas en particulier de la toxoplasmose, la cryptosporidiose, et des microsporidioses.

*En raison de cette variété d'expression pathologique, les attitudes sont très contrastées vis à vis de ses parasitoses, allant d'une totale banalisation, à une prise en considération exclusive du risque de complication. Ceci a pu conduire, dans le premier cas, à une absence de prise en compte d'un risque sanitaire pourtant réel et dans l'autre à la généralisation d'attitudes thérapeutiques ou prophylactiques mal adaptées. L'exemple de l'amibiase est démonstratif. Il existe 7 espèces d'amibes parasites chez l'homme dont une seule, *Entamoeba histolytica* est pathogène. Or, la confusion est fréquente, chez les biologistes et les cliniciens et il est classique de constater qu'au vu d'un résultat d'examen de selles mentionnant « présence de kystes ou de formes végétatives » d'une espèce pourtant non pathogène, les patients soient traités par des amoebicides alors que ces parasites ne justifient d'aucun traitement. À l'inverse, la présence de kystes de *Giardia* dans les selles est souvent considérée comme banale et non traitée, alors qu'il existe un risque certain de gastroentérite et de contamination interhumaine.*

Ces confusions sont en grande partie liées à la méconnaissance de ces parasites et de leur épidémiologie.

VERS UNE MEILLEURE PRISE EN COMPTE DU RISQUE PARASITAIRE

Ces dernières années, plusieurs éléments ont amené à reconsidérer les risques sanitaires liés aux protozoaires parasites :

- La survenue d'épidémies de grande ampleur liée à des contaminations de l'eau destinée à la consommation humaine : l'épidémie de cryptosporidiose de Milwaukee

en 1993 et, plus proche de nous, mais de moindre ampleur, les épidémies de Dracy le Fort (2001) et Divonnes les Bains (2003).

- Le SIDA et la révélation du caractère opportuniste de plusieurs protozoaires tels que *Cryptosporidium*, *Toxoplasma gondii*.

- L'émergence de nouveaux pathogènes, souvent révélés chez les malades immunodéprimés mais dont l'importance dans la population générale reste encore mal définie : microsporidies, *Cyclospora*.

- Le développement de nouveaux outils analytiques, notamment moléculaires, appliqués à l'identification spécifique des parasites, chez l'homme et dans l'environnement.

- La perception des conséquences sanitaires et économiques potentielles de ces parasitoses.

VERS UNE DÉMARCHE D'ANALYSE DE RISQUE

Ces données ont conduit vers une attitude plus analytique visant à mieux caractériser les risques parasitaires et apporter des éléments de gestion et de prévention adaptés au niveau de risque. On peut schématiquement présenter ces démarches en suivant la méthodologie de l'analyse de risque.

La caractérisation du danger

Jusqu'à ces dernières années, l'identification des parasites était exclusivement basée sur la microscopie optique ou électronique. Le développement des techniques de biochimie et de biologie moléculaire a permis de sensibiliser la recherche des parasites et d'apporter de nouvelles informations sur l'épidémiologie et la virulence de certaines espèces. Un exemple peut être apporté par *Entamoeba histolytica* / *dispar* qui sont des amibes morphologiquement identiques, mais dont il a pu être démontré sur des caractéristiques biochimiques et génotypiques qu'il s'agissait de deux espèces distinctes dont une seule, *E. histolytica*, était pathogène, confirmant ainsi l'hypothèse émise par E. Brumpt en 1930 sur des critères expérimentaux. De même, l'analyse génomique de *Cryptosporidium*, a permis d'identifier plusieurs génotypes dont le type I (appelé maintenant *Cryptosporidium hominis*) purement anthroponotique et type II (*Cryptosporidium parvum*), zoonotique. Ces nouvelles données ont des conséquences certaines en terme de prise en charge thérapeutique et de prévention.

La caractérisation moléculaire et biochimique des facteurs de la virulence est l'un des principaux axes de recherche en parasitologie fondamentale, notamment sur *E. histolytica*, *Giardia*, *Cryptosporidium* et *Toxoplasma gondii*.

Évaluation de la diffusion du danger et de l'exposition

Ce point « clé » de l'analyse quantitative du risque se heurte à de grandes difficultés en parasitologie, notamment du fait que la plupart de ces parasites ne peuvent pas se cultiver. Les recherches de parasites dans l'environnement, l'eau et l'alimentation sont encore très largement basées sur l'examen microscopique après concentration de l'échantillon. Depuis peu, des techniques normalisées ont été développées associant filtration, immunocapture et immunorévéléation (norme Afnor NF T 90-455, juillet

2001 pour *Cryptosporidium*, normes US-EPA 1623 pour *Cryptosporidium* et *Giardia*) mais le rendement de ces techniques reste encore insuffisant pour détecter de faibles niveaux de contamination. Pour *Cryptosporidium*, cet outil est cependant suffisamment performant et reproductible pour permettre d'établir des plans de surveillance. À ce titre, l'Angleterre a une position pilote, basée sur une obligation réglementaire d'évaluation de la contamination des ressources et de surveillance en continu de l'eau produite.

Dans le cadre de l'évaluation de la diffusion du danger, les techniques de biologie moléculaire arrivent également en « force » soit par PCR classique ou PCR ou quantitative, mais l'interprétation de la mise en évidence d'ADN parasitaire dans un échantillon, en terme de risque infectieux, reste incertaine.

Malgré ces évolutions, il faut reconnaître que les connaissances sur la contamination environnementale et alimentaire restent encore faibles ou nulles pour de nombreux parasites. De même l'évaluation de la viabilité et de l'infectiosité des parasites repose encore sur des techniques très lourdes (infection expérimentale chez l'animal), peu sensibles et non standardisées.

Relation dose-effet

C'est la deuxième étape clé de l'analyse quantitative de risque et certainement la plus difficile à apprécier. Une relation dose-effet a pu être établie chez l'homme pour deux parasitoses, la cryptosporidiose et la gardiase, par des études sur volontaires sains. Pour *Giardia*, ces données sont anciennes et mériteraient d'être confirmées. Pour *Cryptosporidium*, des études très récentes (2003, 2004) montrent une variabilité de la dose infectante 50 en fonction de la souche ; aucune étude n'est encore disponible pour le génotype I. Pour *Toxoplasma gondii*, on ne dispose que de données issues de modèles expérimentaux animaux. Aucune donnée n'est disponible pour les autres protozoaires.

Modélisation mathématique

À partir des données issues de la caractérisation du danger, de sa diffusion, de l'exposition et de la relation dose-effet, il est possible de construire des modèles intégrant l'ensemble de ces données et réaliser une estimation quantitative du risque. Les progrès méthodologiques considérables de ces dernières années, avec l'introduction des méthodes d'analyse probabiliste, ont permis d'intégrer la variabilité, traduisant la diversité et l'hétérogénéité du risque d'un individu à l'autre et l'incertitude liée à l'ignorance partielle ou au manque de connaissance sur l'une des données composant le modèle. Ces modèles ont le grand avantage de permettre d'élaborer des scénarii dans lesquels, il est possible d'intégrer et de faire varier un ou plusieurs paramètres, par exemple le niveau d'abattement d'une technique de traitement appliquée sur une denrée alimentaire.

À l'heure actuelle, le seul modèle validé en parasitologie est celui de *Cryptosporidium* appliqué au risque lié à la consommation d'eau. Il est ainsi possible de caractériser la relation entre le risque quotidien ou annuel de cryptosporidiose en fonction du niveau de contamination de la ressource et d'y incorporer l'abattement appliqué lors du traitement de l'eau. Ce modèle, développé par l'Afssa en 2002 représente un outil de gestion applicable à l'évaluation du risque lié à une ressource sensible mais aussi à l'évaluation des risques en cas de contamination accidentelle. Par exemple, son application lors de l'épidémie de Divonnes les bains a permis de produire une estimation du nombre de cas attendus, compatible avec le nombre de cas observés.

Il n'en reste pas moins que le développement de modèles mathématiques d'analyse quantitative de risque restera difficile à développer pour d'autres parasites en l'absence de données sur la diffusion de danger et sur la relation dose-effet.

VERS DE NOUVELLES OPTIONS DE GESTION ?

La gestion des risques parasitaires comprend une composante individuelle associant thérapeutique et recommandations de prévention et une composante collective, associant des mesures de contrôle de la diffusion du danger et une large information sur le risque parasitaire. Dans les deux cas, l'efficacité de ces mesures devrait pouvoir être évaluée.

Possibilités et perspectives thérapeutique

La pharmacopée anti-parasitaire est très restreinte. Pour plusieurs parasitoses, il n'existe pas de traitement réellement efficace ou bien toléré permettant d'éradiquer le parasite (cryptosporidiose, microsporidiose, toxoplasmose). Malheureusement, la recherche thérapeutique dans les protozooses digestives reste encore extrêmement limitée voire totalement absente pour certaines d'entre elles, conduisant à des situations d'impasse thérapeutique. Pourtant, les données récentes de la biologie cellulaire et de la génomique, avec notamment le séquençage complet du génome de plusieurs protozoaires (*Encephalozoon cuniculi*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*) ouvrent de nouvelles perspectives de recherche pharmacologique. Parmi les nouvelles cibles potentielles, une des plus prometteuses est certainement l'apicoplaste, structure procaryotique acquise par endobiosymbiose chez les parasites de la famille des *Apicomplexa* (dont *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium*). Cet organelle, dont la fonction est encore mal définie, mais qui est vital pour le parasite, est le siège de voies métaboliques absentes chez les vertébrés, et qui sont donc des cibles spécifiques pour des anti-parasitaires.

Un effort important reste à faire, sur le plan fondamental mais aussi pour la promotion d'études cliniques visant à

évaluer l'efficacité de nouvelles molécules, en particulier dans la toxoplasmose congénitale et dans les parasitoses opportunistes. Il en est de même pour l'étude des agents physiques ou chimiques pouvant être utilisés comme désinfectants et en agroalimentaire.

Prévention individuelle

Aucune chimioprophylaxie individuelle efficace ne peut être recommandée en raison du faible nombre de molécules antiparasitaires disponibles, de leur efficacité limitée et de leur tolérance. Quant aux perspectives vaccinales chez l'homme, elles ne sont pas réalistes à court ou moyen terme.

Les mesures individuelles de prévention des protozooses digestives portent donc avant tout sur l'hygiène alimentaire et corporelle. Pour la toxoplasmose, s'ajoutent des recommandations spécifiques, portant sur la consommation de la viande, ces mesures étant ciblées par un dépistage préalable des sujets à risque (femmes séro-négatives).

Cependant, l'efficacité des mesures de prévention reste difficile à évaluer en l'absence de marqueurs fiables permettant de mesurer l'incidence et la prévalence des infections parasitaires. Ces incertitudes ont amené certains pays à reconsidérer la validité des programmes de dépistage, notamment pour la toxoplasmose, en raison d'une incapacité ou d'une grande difficulté à les évaluer en terme de coût / bénéfice.

Prévention collective

La prévention collective regroupe tout un ensemble de mesures destinées à réduire le risque parasitaire pour la population. Pour les parasitoses, et plus particulièrement pour les zoonoses, les actions à mettre en place impliquent une coordination de nombreux domaines d'activité (publics ou privés) portant sur l'environnement, l'agriculture, l'alimentation et la santé. Une grande partie de ces mesures sont couvertes par des cadres réglementaires. Malheureusement, ceux-ci ne prennent pas toujours suffisamment en compte le risque parasitaire, qui a pourtant ses particularités.

Dans le domaine de la prévention, l'analyse quantitative du risque peut être considéré comme un bon outil de gestion et d'aide à la décision. L'exemple donné précédemment pour *Cryptosporidium* illustre bien son apport dans l'analyse des options de gestion d'une ressource potentiellement contaminée. De plus, le coût direct et indirect d'une épidémie incite très fortement à privilégier une démarche préventive, basée sur une estimation préalable du risque.

CONCLUSIONS

Ces dernières années ont vu une grande évolution en terme de prise en compte des risques parasitaires et de leurs conséquences sanitaires et économiques, notamment par le développement de démarches analytique plus construite, destinées à optimiser les options de gestion et de prévention.

Cependant, force est de constater que les données sur la contamination environnementale ou alimentaire par les parasites restent encore très insuffisantes, de même que les données sur l'incidence et la prévalence de ces infections chez l'homme et chez l'animal.

Dans ce domaine, un très gros effort reste à faire auprès des praticiens, des biologistes avec la nécessité d'une coordination et d'une centralisation du recueil des données. Au niveau français et au niveau européen, plusieurs initiatives sont actuellement en cours pour la mise en place de réseaux et de collaborations permettant une synergie entre les structures d'évaluation des risques, d'analyse épidémiologique et de gestion sanitaire.

ANNEXE

À PROPOS DES ÉPIDÉMIES RÉCENTES DE CRYPTOSPORIDIOSE SURVENUES EN FRANCE : RÉFLEXIONS ET PROPOSITIONS

En France, deux épidémies sont survenues récemment : l'une à Dracy-le-Fort et l'autre à Divonnes les Bains. Dans les deux cas, elle résultent d'une pollution du réseau de distribution d'eau à partir d'un retour d'eau accidentel de la station d'épuration.

Dans les deux épidémies, l'analyse des événements fait apparaître plusieurs difficultés :

- faible documentation parasitologique des cas de cryptosporidiose humaine : nombre limité de prélèvements et / ou d'examen parasitologiques des selles ; peu d'information sur la capacité de diagnostic de la cryptosporidiose des laboratoires locaux ; dispersion des résultats,
- absence (ou très petit nombre) de données sur le génotype parasitaire, qui permettrait une évaluation de l'origine de la contamination (humaine ou animale),
- conditions de réalisation difficiles et coût élevé des analyses d'eau ; difficulté d'interprétation des résultats (viabilité des oocystes, signification des valeurs observées),
- absence d'une réelle estimation du risque pour la population (en partie faite à Divonnes),

- incertitude sur les moyens de gestion les plus appropriés, notamment pour ce qui concerne la décision de levée des mesures de restriction d'usage,
- incertitude sur le risque post-épidémique, notamment en cas d'exploitation d'une ressource en zone karstique (Divonnes les Bains).

Les conclusions d'analyse de ces deux épidémies sont convergentes avec celles du rapport de l'Afssa *Infections à protozoaires liées aux aliments et à l'eau, Cryptosporidium sp.* (Afssa, 2002) qui préconisait un certain nombre de recommandations visant à améliorer les conditions de diagnostic, d'analyse épidémiologique et d'estimation du risque lié à la cryptosporidiose en France.

De façon plus spécifique, ces recommandations portent sur les points suivants :

- améliorer le recueil de données humaines et animales sur la cryptosporidiose : estimation de la prévalence du portage, de l'incidence de l'infection dans la population générale et dans les populations plus sensibles (enfants, immunodéprimés),
- la mise en place éventuelle d'une épidémiologie-surveillance,
- améliorer les techniques de diagnostic et d'identification spécifique et sub-spécifique (génotypage) des cryptosporidies dans divers support alimentaires,
- obtenir des informations sur la contamination des aliments autres que l'eau (coquillages, végétaux)
- améliorer les techniques visant à estimer la viabilité et l'infectivité des oocystes isolés de l'eau ou l'alimentation,
- assurer une meilleure information des médecins, des biologistes et des responsables de santé publique sur la cryptosporidiose (manifestations cliniques, conditions de survenue, prévention, diagnostic, traitement), dans le but de faciliter la prévention de la cryptosporidiose et la gestion d'une éventuelle épidémie,
- mettre en place, appliquer et adapter localement les méthodes d'analyse quantitative du risque de cryptosporidiose liés à l'eau de distribution, en se basant sur une analyse préalable des ressources.

L'application de ces recommandations suppose un investissement humain et technique important et spécialisé en Parasitologie, ainsi qu'une articulation des actions avec les différentes structures de santé publique ayant en charge la sécurité alimentaire et l'épidémiologie-surveillance, chez l'homme et chez l'animal.

À l'heure actuelle, les compétences dans le domaine de la cryptosporidiose **existent en France** mais sont réparties dans plusieurs secteurs professionnels et avec des niveaux de compétence variés :

- le secteur public de la santé, notamment dans les laboratoires de Parasitologie hospitaliers (universitaires

ou non), compétents pour le diagnostic de la cryptosporidiose humaine, parfois associés à des unités de recherche spécialisées.

- le secteur public de santé animale, dans les écoles vétérinaires et les laboratoires départementaux dont plusieurs disposent d'une unité de Parasitologie,
- les laboratoires chargés des analyses microbiologiques des eaux et des aliments, compétents dans la recherche de *Cryptosporidium* dans l'eau (laboratoires agréés),
- les laboratoires privés, réalisant en interne ou à titre de prestataires, les recherches de cryptosporidies dans l'eau.

Un projet de regroupement de compétences, constituant un « maillage » de laboratoires sur l'ensemble du territoire national (réseau) est envisagé au sein de la communauté parasitologique hospitalière. Ce fonctionnement en réseau, basé sur des laboratoires référents permettrait certainement d'améliorer notre approche épidémiologique de la cryptosporidiose en France et servir directement les objectifs de prévention et de gestion de ce risque. Ce réseau aurait également pour objectif de s'associer aux structures d'évaluation scientifique et de vigilance des risques sanitaires français et européens, constituant ainsi un outil de dynamisation de la recherche sur *Cryptosporidium* et sur les autres protozoaires contaminant l'eau ou l'alimentation.

LA VIROLOGIE DES EAUX - COMPLEXITÉ DE L'APPROCHE ET ENJEUX SANITAIRES

Christophe Gantzer
Faculté de pharmacie de Nancy I

Plus de 150 sérotypes de virus entériques pathogènes pour l'homme ont été identifiés à ce jour. Ils sont excrétés en grandes quantités dans les selles des individus infectés (10^3 à 10^{10} particules virales / g de selle). Parmi les plus courants, il est possible de distinguer :

- les virus des gastro-entérites (*Norovirus*, *Rotavirus*, *Adenovirus*, *Astrovirus*...)
- les virus des hépatites (virus de l'hépatite A et E)
- les *Enterovirus* (*Poliovirus*, *Coxsackievirus A* et *B*, *Echovirus*, *Enterovirus* non classés) responsables de pathologies très diverses (méningite, atteinte cardiaque, paralysies...).

Ces virus nus de 20 à 80 nm, sont transmis par voie féco-orale soit directement de personne à personne, soit indirectement *via* l'eau et les aliments. Si l'on se fonde uniquement sur des symptômes cliniques, 32 à 42% des épidémies alimentaires liées à des micro-organismes entériques aux USA seraient d'origine virale. Ce sont les *Norovirus* et le virus de l'hépatite A qui sont les plus souvent décrits lors d'épidémies d'origine hydrique ou alimentaire dans les pays industrialisés. De plus l'incidence des *Norovirus* en particulier est reconnue comme étant en hausse par l'OMS (augmentation vraisemblablement associée à une surveillance plus efficace et aux développements d'outils de détection plus performants). Les *Norovirus* sont à l'origine de plus de 85% des épidémies de gastro-entérites non bactériennes. Aux USA, ces virus seraient responsables à eux seuls de 23 millions de cas de gastro-entérites, 50000 hospitalisations et 300 morts chaque année (Mead *et al.* 1999). Manutention d'aliments par des personnes infectés, fruits de mer élevés dans des zones polluées, défaillance du traitement de désinfection des eaux, brèche dans le réseau de distribution des eaux potables, baignade dans des eaux polluées sont autant de causes identifiées comme pouvant être à l'origine de ces épidémies virales (pour une revue complète voir Koopmans *et al.* 2002 et Koopmans and Duizer 2004).

L'estimation de l'incidence des maladies virales d'origine hydrique ou alimentaire reste problématique car il faut simultanément :

- identifier les personnes infectées. Or même si certaines maladies infectieuses d'origine hydrique ou alimentaire peuvent être relativement graves voire fatales, une grande partie d'entre elles sont caractérisées par des symptômes moins sévères. Ceci est particulièrement vrai pour les *Norovirus* qui sont généralement associés à des diarrhées et des vomissements sur une courte durée (2 jours en moyenne). Ce type de pathologie peut être largement sous-estimé par une structure de veille sanitaire classique (Mead *et al.* 1999).
- détecter et identifier le virus dans les selles des personnes infectées. Il faut pour cela disposer de selles prélevées dans la semaine qui suit les symptômes.
- identifier l'eau ou l'aliment responsable de l'infection et y détecter le virus. Cela implique d'abord une enquête épidémiologique poussée, ensuite de disposer de prélèvements (aliments ou eaux) supposés être à l'origine de l'infection et enfin d'être capable de détecter et identifier le virus.

En terme de prévention, dans une eau potable par exemple, l'absence d'indicateur bactérien de pollution fécale est sensée garantir l'absence de virus pathogènes. Or il est largement reconnu à l'heure actuelle que ces indicateurs ne reflètent pas le comportement des virus. De manière exemplaire Grabow *et al.* (2001) remettent totalement en cause leur utilisation pour l'évaluation de la contamination virale. Ces auteurs ne retrouvent en effet aucun des indicateurs (flore totale, coliformes fécaux et totaux) dans de l'eau de distribution dont 23% des échantillons sont positifs en virus pathogènes supposés infectieux (*Enterovirus* 17%, *Adenovirus* 4% et virus de l'hépatite A 3%) (n = 413). De même Haramoto *et al.* (2004) détectent du génome de *Norovirus* génotype 1 et 2 dans respectivement 4% et 7% de différentes eaux de distribution respectant parfaitement la législation en vigueur au Japon.

L'importance des épidémies virales d'origine hydrique et alimentaire, la difficulté de définir l'incidence de ces maladies virales mais aussi les limites des indicateurs bactériens de pollution fécale pour identifier une pollution virale sont à l'origine de nombreuses réflexions pour savoir si de nouveaux paramètres de contrôle doivent être mis en place pour une meilleure prise en compte du risque viral lié à l'eau ou aux aliments. Deux alternatives sont possibles : la recherche directe de virus pathogènes ou la recherche d'indicateurs de pollution fécale d'origine virale (bactériophages fécaux). Seule la recherche de virus pathogènes est discutée dans l'exposé (pour une revue concernant les bactériophages voir Grabow 2001).

L'analyse virologique d'une eau ou d'un aliment est basée sur trois étapes : la concentration (eau) ou l'extraction / concentration (aliments), la détection et l'interprétation du résultat.

La concentration des virus à partir d'échantillons d'eaux (jusqu'à 1000 litres pour une eau potable) s'effectue généralement par des techniques d'adsorption-élution impliquant l'utilisation de différents supports chargés (membrane, laine de verre, poudre de verre...). Il s'agit d'adsorber les virus sur le support *via* des interactions électrostatiques, hydrophobes... puis de les éluer dans une solution tampon permettant d'inverser ce processus (pH > 9, extrait de bœuf, détergents...). Des techniques d'ultrafiltration peuvent aussi être envisagées pour les eaux peu chargées en matières en suspension. Globalement ces techniques permettent d'obtenir les virus sous un volume compris entre 4 et 300ml. En fonction de la technique de détection utilisée il est généralement nécessaire de réduire encore ce volume en y associant des techniques de concentration secondaire (ultrafiltration, ultracentrifugation, floculation...). Le volume obtenu est alors compris entre 100µl et 1ml. Dans les conditions idéales et avec certains virus modèles (*Poliovirus 1*...) les rendements de concentration sont compris entre 60 et 100%. Néanmoins il est évident que ces rendements varient en fonction du type d'eau (turbidité, conductivité...) et du type de virus recherché.

L'extraction concentration des virus à partir d'aliment comprend une étape d'extraction et une étape de concentration. L'extraction consiste à homogénéiser l'échantillon (broyage, ultrasons...) puis à éluer les virus de la matrice solide avec des tampons comparables à ceux décrits ci-dessus. Certains protocoles incluent uniquement une élution de la surface de l'aliment. L'éluat est ensuite concentré par des techniques comparables aux concentrations secondaires décrites ci-dessus.

La détection des virus dans l'environnement doit prendre en considération la faible concentration virale susceptible d'y être retrouvée. Ainsi la culture cellulaire et les techniques d'amplification génique sont les seules adaptées à ce type de matrice.

La culture cellulaire est la technique de référence car c'est la seule qui permette de témoigner du caractère infectieux des virus isolés. Elle est en outre sensible et quantitative. Néanmoins c'est une technique longue (une à plusieurs semaines), fastidieuse et qui ne permet pas la détection de tous les sérotypes viraux. Par exemple les *Norovirus* ne se multiplient sur aucun système cellulaire connu. Il est donc clair que cette technique est inadaptée pour une analyse virologique de routine.

Les techniques d'amplification génique de type (RT-)PCR semblent présenter tous les avantages de la technique idéale (sensible, spécifique, rapide, adaptée à tous les sérotypes viraux) mais elles ne permettent pas de témoigner du caractère infectieux du virus. De plus, il est important de signaler que l'utilisation des techniques moléculaires est associée à un risque important de faux positifs (contamination de laboratoire, amplification non spécifique...). Lamothe *et al.* (2003) décrivent par exemple 2,44% de faux positifs lors de l'analyse de plus de 700 échantillons d'eaux minérales. Le risque de faux négatif doit aussi être pris en compte en incorporant des étalons internes lors des réactions d'amplification pour déceler la présence éventuelle d'inhibiteurs qui sont nombreux dans les matrices environnementales.

Le critère d'infectiosité disponible après mise en culture des virus et la rapidité de la (RT-)PCR ont conduit certains auteurs à combiner les deux techniques de détection virale en réalisant une (RT-)PCR sur les surnageants de culture cellulaire : il s'agit de l'ICC (RT-)PCR (Integrated Cell Culture (RT-)PCR). Le principal inconvénient de cette technique réside dans le fait qu'actuellement il est impossible de multiplier tous les virus entériques sur culture de cellules. C'est le cas notamment des *Norovirus*.

La dernière étape consiste à interpréter le résultat de l'analyse. Comme souligné ci-dessus la (RT-)PCR ne détecte que des fragments de génome viral et de ce fait ne permet pas de témoigner du caractère infectieux du virus isolé. Ce point est fondamental et est à l'origine de nombreux débats. Pour certains, l'ARN génomique serait « rapidement » dégradé dans le milieu hydrique et de ce fait le génome détecté ne « pourrait » être qu'encapsidé et donc appartenir à un virus complet « potentiellement » pathogène. D'autres rappellent que le devenir de l'ARN génomique dans l'environnement hydrique est mal connu et surtout que l'existence d'une capsidie n'est de loin pas un critère suffisant pour témoigner du caractère infectieux du virus. En effet une capsidie peut avoir subi des dommages qui rendent le virus incapable de se fixer sur les cellules sensibles et donc de les infecter. Avec les unités virales infectieuses nous disposons de repères bien définis (doses minimales infectantes, durée de survie, sensibilité à la chaleur, aux désinfectants...) qui permettent l'estimation d'un risque pour la santé publique s'il y a détection de ce type de particules dans le milieu hydrique. Pour les génomes viraux à l'inverse ces données n'existent pas ou sont excessivement fragmentaires. Aussi

avant de pouvoir tirer des conclusions à la suite de la détection de génome dans une eau ou un aliment, il semble impératif de se poser la question suivante : les connaissances concernant la dégradation des génomes viraux (ou des particules non infectieuses en général) sont-elles arrivées à un niveau suffisant pour utiliser les techniques de biologie moléculaire comme outil analytique visant à estimer le risque viral pour l'homme *via* l'eau et les aliments ?

En fait, dans l'état actuel des connaissances après une analyse par biologie moléculaire, le niveau d'information est différent selon le résultat obtenu.

L'obtention d'un résultat négatif, dans les conditions strictes d'assurance qualité (étalon interne...), permet de témoigner de l'absence du virus infectieux correspondant dans le volume analysé.

L'interprétation semble beaucoup plus complexe dans le cas d'un résultat positif même si celui-ci est obtenu selon des critères strictes d'assurance qualité et ceci pour plusieurs raisons :

- D'une manière générale, de très nombreuses études bibliographiques ont montré qu'il était possible de détecter du génome sans pour autant isoler le virus infectieux correspondant.
- La cinétique d'inactivation d'une particule virale infectieuse et la cinétique de dégradation d'un fragment de génome sont souvent différentes dans un même milieu. Dans une eau minérale par exemple Gassilloud *et al.* 2003 observent une persistance plus grande du génome viral que des virus infectieux quelle que soit la température (entre 4°C et 35°C) et quel que soit le virus (*Calicivirus félin f9*, *Poliovirus 1*). À 35°C par exemple, le *Poliovirus 1* infectieux subi une inactivation de l'ordre de 4 unités logarithmiques en 20 jours, alors que la dégradation du fragment génomique détecté par RT-PCR n'est même pas de 2 unités logarithmiques en 80 jours. Ceci implique que plus l'origine de la contamination est éloignée dans le temps plus la discordance entre génome et particule infectieuse est importante.
- Très peu de données sont disponibles sur les mécanismes d'inactivation d'une particule virale : dégradation du génome et dégradation de la capsid.
- Les paramètres impliqués dans la perte d'infectiosité et la dégradation du génome peuvent être différents. La température reconnue depuis des années comme étant un des paramètres les plus importants pour la perte d'infectiosité a un effet très faible sur la dégradation du génome. En fait il semble probable que ce paramètre augmente simplement la cinétique de dégradation de la capsid et que le génome n'est dégradé que dans un second temps par exemple par des ribonucléases.
- La dose virucide, basée sur des mesures d'infectivité, n'est pas la dose qui permet d'éliminer toute trace de génome viral. Ainsi, il a été largement démontré que pour une dose donnée de désinfectants (chlore, ozone,

UV...), l'abattement en virus infectieux est toujours très largement supérieur à celui obtenu pour des fragments de génome détectés par PCR. En fonction des données de la littérature, il semblerait que pour garantir l'absence de génome, les doses de désinfectant devraient être revues à la hausse.

En fonction de ces données, il semble très difficile de relier la simple présence de génome à un risque infectieux mais il est possible de considérer la présence de génome viral comme un indicateur d'une contamination virale plus ou moins ancienne.

En conclusion, il semble extrêmement aléatoire dans l'état actuel des connaissances de vouloir relier la détection de génome viral à la présence du virus infectieux correspondant. Par contre la présence de génome viral peut être considérée comme un indicateur d'une pollution virale plus ou moins ancienne. Dans quelle mesure cet indicateur surestime le risque infectieux doit encore être précisé par des études fondamentales concernant les mécanismes de dégradation d'une particule virale (capsid et génome). Ceci est d'autant plus important après un traitement de désinfection pour lesquelles de nombreuses données sont disponibles au sujet de la perte d'infectiosité mais très peu sont disponibles concernant la dégradation du génome.

À l'inverse, l'absence de génome viral est relativement informative puisqu'elle est synonyme d'absence de virus infectieux. La biologie moléculaire permet en outre une recherche rapide du virus et constitue donc un outil puissant d'investigation sur l'origine des épidémies.

Références bibliographiques

- Gassilloud B., Schwartzbrod L. and Gantzer C. (2003) Presence of viral genome in mineral water : a sufficient condition to assume infectious risk ? *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (7), 3965-3969.
- Grabow W.O.K. (2001) Bacteriophages : Update on application as models for viruses in water. *Water SA* 27 (2) 251-268.
- Grabow W.O.K., M.B. Taylor and J. C. Villiers (2001) New methods for the detection of viruses : call for review of drinking water quality guidelines. *Water Science and Technology*. 43 (12) 1-8.
- Haramoto E., H. Katayama and S. Ohgaki (2001) Detection of Noroviruses in tapwater in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (4) 2154-2160.
- Koopmans M., C-H von Bonsdorff, J. Vinjé, D. de Medici and S. Monroe (2002). Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews*. 26, 187-205.

Koopmans M. and E. Duizer (2004) Foodborn viruses : an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*. 90 (1) 23-41.

Lamothe G. T., T. Putallaz, H. Joosten and J. D. Marugg (2003) Reverse transcription-PCR analysis of bottled and natural waters for the presence of Noroviruses. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (11) 6541-6549.

Mead P. S., L. Slutsker, V. Dietz, J. S. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin and R. V. Tauxe (1999). *Emerging Infectious Diseases* 5 (5) 607-625.

ATELIERS

LE RÔLE DE L'ENVIRONNEMENT ET DES MODES D'ÉLEVAGE DANS LA DISSÉMINATION DE L'ANTIBIORÉSISTANCE

Arlette Laval

École nationale vétérinaire de Nantes I

Jean Lesne

École nationale de la santé publique

L'antibiorésistance est devenue une préoccupation majeure car il est de plus en plus évident que nous devons vivre avec un nombre limité de molécules. Elles doivent donc impérativement être utilisées à bon escient.

Les enjeux concernent bien sûr en priorité la santé humaine, dont les moyens de gestion doivent être préservés à tout prix. Ils concernent ensuite la santé animale, également très importante pour garantir la qualité microbiologique des aliments et la santé des écosystèmes puisque l'environnement peut se révéler un réservoir de gènes de résistance transférables à des bactéries humaines, pathogènes ou non. Dans ce contexte, l'usage des antibiotiques chez les animaux est devenu une vaste source de polémique.

Les grandes zones d'élevage sont particulièrement vulnérables, car les réseaux hydriques y sont soumis à une pollution importante dont l'impact est actuellement difficile à évaluer du fait du manque de données précises sur le sujet. Les conséquences de l'utilisation des antibiotiques en élevage sont doubles. Ils peuvent d'abord agir en polluant directement l'environnement par les résidus émis à partir de animaux traités, soit sous la forme du principe actif, soit sous forme de métabolites actifs non métabolisés. Cet aspect est bien documenté dans le chapitre « écotoxicité » des dossiers d'Autorisation de Mise sur le Marché pour les médicaments et d'agrément pour les pesticides. Moins connues et plus difficiles à évaluer sont les conséquences de la création d'une pression de sélection sur la flore bactérienne pathogène et commensale des animaux traités, avec production d'un « flux de gènes » qui seront disséminés dans l'environnement par de très nombreuses bactéries. C'est cet aspect du risque qui commence à susciter l'intérêt un peu partout dans le monde.

LES DIFFÉRENTS TYPES D'ÉLEVAGES ET LES MODES DE TRAITEMENT

Les différents types d'élevage

Selon l'importance des effectifs et la densité des animaux entretenus à l'extérieur ou à l'intérieur, on parle d'élevages extensifs par opposition aux élevages intensifs ou organisés, souvent qualifiés d'élevage « industriels ». Les premiers sont considérés comme peu polluants. Ils concernent surtout les ruminants. L'élevage plein-air des monogastriques, porcs et volailles, reste mineur par rapport à la production « organisée ». Les effluents de ces élevages sont directement rejetés dans l'environnement.

Dans les élevages organisés, les effluents solides (fumier) ou liquides (lisier) sont épandus après un stockage qui joue un rôle déterminant, à la fois quantitatif et qualitatif, sur le devenir des bactéries. La durée de stockage et l'effet des produits utilisés pour désodoriser le lisier interviennent très certainement. L'évolution de la flore devrait donc finalement être prévisible. Il devrait aussi être possible d'orienter quantitativement et qualitativement les émissions microbiennes.

Les animaux les plus dangereux pour l'environnement sont sans nul doute les poissons puisque les traitements sont directement appliqués dans l'eau.

Les modes de traitement

L'application des traitements doit être adaptée à l'espèce animale : les traitements injectables sont bien adaptés aux animaux de grande taille (bovins) et aux petits

effectifs. Les injections sont impératives chez les ruminants sevrés dont la flore ruménale est fragile et peut être profondément perturbée par les traitements antibiotiques administrés par voie orale. La voie orale est préférée pour les volailles et les porcs qui doivent recevoir un traitement collectif lorsque dès que les maladies infectieuses prennent de l'extension. Dans le cas des volailles, l'eau est le vecteur le plus utilisé alors que chez le porc, l'aliment reste intéressant même si le recours aux solutions et poudres orales se développe de plus en plus.

Les préparations injectables permettent de bien contrôler la dose administrée, mais souvent le traitement est mal suivi car elles nécessitent des interventions répétées qui deviennent rapidement pénibles pour l'opérateur en particulier dès que l'animal retrouve de la vigueur !... Leur innocuité pour l'environnement n'est d'ailleurs pas totale car de nombreux antibiotiques ont un cycle entéro-hépatique et sont éliminés dans l'intestin sous forme active à des concentrations sub-inhibitrices. La voie parentérale ne peut donc pas être considérée comme totalement inoffensive.

Les traitements collectifs présentent un risque supérieur de diffusion de la résistance, puisque le nombre de sujets traités est supérieur.

La voie orale est précieuse pour les monogastriques dès que les effectifs dépassent une centaine d'individus. L'eau de boisson est un vecteur facile à utiliser chez les volailles avec un simple bac de rétention d'eau. Chez le porc, elle nécessite un matériel adapté qui se vulgarise de plus en plus. Dans tous les cas, il existe un risque de fuite d'eau médicamenteuse à partir des abreuvoirs, avec pression de sélection exercée directement sur les bactéries de l'environnement.

L'aliment est un vecteur bien adapté aux traitements des animaux en incubation dans un élevage où une maladie se déclare. Il présente l'immense avantage de garantir l'observance du traitement car sa préparation et son administration échappent totalement à l'éleveur ce qui n'est pas le cas avec la voie parentérale et l'eau de boisson.

Quelle que soit la voie de traitement utilisée, l'antibiotique doit accéder au siège des lésions, où il crée une pression de sélection sur les bactéries pathogènes. Si le traitement échoue ou si la guérison bactériologique n'est pas totale, des bactéries souvent devenues moins sensibles risquent d'être éliminées dans l'environnement. Mais parallèlement, la flore commensale subit aussi cette pression de sélection et risque de constituer un réservoir de gènes de résistance qui seront éliminés à partir de la sphère oro-nasale, par la flore cutanée et surtout par voie intestinale, directement ou à travers un cycle entéro-hépatique.

En matière de thérapeutique et de gestion de la résistance, les monogastriques, poissons compris bien entendu, sont considérés comme potentiellement dangereux car ils sont nombreux et émettent donc de grandes quantités de déchets dans l'environnement. L'usage des

antibiotiques comme régulateurs de flore à des fins essentiellement zootechniques a contribué à noircir leur image. Leur abandon est maintenant programmé ce qui mettra fin à un long débat.

La prise de conscience du risque inhérents aux traitements vétérinaires a conduit à une réflexion globale sur les bonnes pratiques cliniques et à une évaluation du risque-bénéfice des méthodes appliquées.

Influence des choix thérapeutiques et du mode de prescription

Ils sont très importants car l'émergence des résistances et la pérennisation de ces dernières dans la flore des animaux dépend beaucoup du choix de l'antibiotique et de son mode de distribution. Quelques idées ressortent des nombreux travaux publiés sur ce sujet :

- Il ne faut pas répéter les traitements avec la même molécule ou avec des molécules de la même famille, d'où l'importance du traitement initial, du choix des posologies et de la durée des traitements.
- Les traitements des sujets jeunes sont beaucoup moins dangereux que ceux des sujets âgés car les quantités distribuées sont très inférieures, les bactéries émises dans l'environnement sont moins nombreuses et la flore a le temps de se reconstituer avec élimination des souches résistantes en cours d'élevage. En effet, pour plusieurs antibiotiques, le coût biologique de la résistance est élevé pour les bactéries et les souches résistantes disparaissent spontanément lorsque la flore sensible peut coloniser de nouveau l'intestin. C'est ce que nous avons montré pour la résistance d'*Escherichia coli* aux quinolones [2].
- La médecine vétérinaire doit privilégier les molécules peu ou pas utilisées en médecine humaine.
- Les antibiotiques induisant l'apparition d'une résistance de nature chromosomique sont moins dangereux que ceux qui induisent l'apparition de supports génétiques transférables.
- Les principes actifs doivent être purifiés. Les résidus de fermentation, peu coûteux, ont largement été utilisés en alimentation animale. Or, peuvent être présents dans le support de l'antibiotique : c'est ce qui a été montré pour le support de l'avoparcine, dans lesquels les gènes de résistance *vanH*, *vanA* et *vanX* ont été identifiés [5]. L'usage des « feed grade » en médecine vétérinaire est actuellement interdit en Europe, mais ce n'est pas le cas dans le reste du monde.
- Tous les médicaments prescrits doivent faire l'objet d'une Autorisation de Mise sur le Marché, garantissant la qualité des matières premières, la stabilité du médicament, son innocuité, son efficacité et pour les antibiotiques, prévoyant le suivi de la résistance.

➤ Le suivi vétérinaire des élevages doit être strict : prescription des traitements dans le cadre d'une bonne connaissance de l'élevage et de la maladie qui est observée, délivrance des antibiotiques exclusivement sur ordonnance, suivi régulier des élevages.

ÉVALUATION DE L'IMPACT DE L'USAGE DES ANTIBIOTIQUES

Suivi des consommations et de la résistance

Dès la prise de conscience du risque que représentait l'usage massif d'antibiotiques dans l'alimentation animale à des fins zootechniques (Antibiotiques Régulateurs de Flore : ARF), des enregistrements des consommations ont été mis en place dans de nombreux pays. C'est l'Europe du Nord qui a commencé, le Danemark se dotant avec DANMAP d'un système particulièrement performant, facilité par la centralisation de la production dans ce pays. En France, des enregistrements précis sur les consommations d'antibiotiques utilisés comme médicaments sont également mis en place sous le contrôle de l'Afssa et de l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire.

Le suivi de l'antibiorésistance a été réalisé en parallèle, en particulier sur *Enterococcus faecium*, la bactérie dont la résistance à l'avoparcine, un ARF de la famille des glycopeptides proche de la vancomycine utilisée en médecine humaine, a été à l'origine des inquiétudes suscitées par l'utilisation des antibiotiques en alimentation animale. La résistance des salmonelles, à l'origine de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) parfois très

graves et celles d'*Escherichia coli*, pathogènes ou traceurs, font également l'objet d'enregistrements attentifs et de programmes de recherche.

Les résultats des suivis danois montrent clairement que l'interdiction des ARF a réduit de façon considérable la consommation d'antibiotiques en alimentation animale, mais que parallèlement, l'augmentation de la pathologie digestive a induit une importante croissance de l'usage d'antibiotiques à titre curatif (figure 1). Par leur effet régulateur sur la flore, les ARF contrôlaient aussi sans doute des bactéries pathogènes qui ont finalement un impact non négligeable sur la santé.

Une conséquence plus positive de l'interdiction des ARF a été la réduction de la résistance des entérocoques à l'avoparcine, qui s'est amorcée rapidement chez le poulet, plus lentement chez le porc (figure 2).

Les données françaises confirment les tendances observées au Danemark [8]. L'interdiction des ARF ne sera totale qu'en décembre 2005, quatre molécules non utilisées en médecine humaine étant encore autorisées. À ce jour, la réduction globale de l'utilisation des antibiotiques est donc moins perceptible que dans les pays d'Europe du Nord. Par contre, si l'on prend l'exemple de la production porcine, considérée comme une grande consommatrice d'antibiotiques, l'augmentation de leur utilisation curative à visée digestive (aminosides, colistine, macrolides) est très nette depuis les restrictions de l'utilisation des ARF comme l'indiquent les enregistrements de l'Afssa-ANMV (tableau I, 7), à l'instar de ce qui est constaté au Danemark. Comme le Danemark, la France s'est dotée d'un réseau de surveillance de l'antibiorésistance en médecine vétérinaire (RESABO).

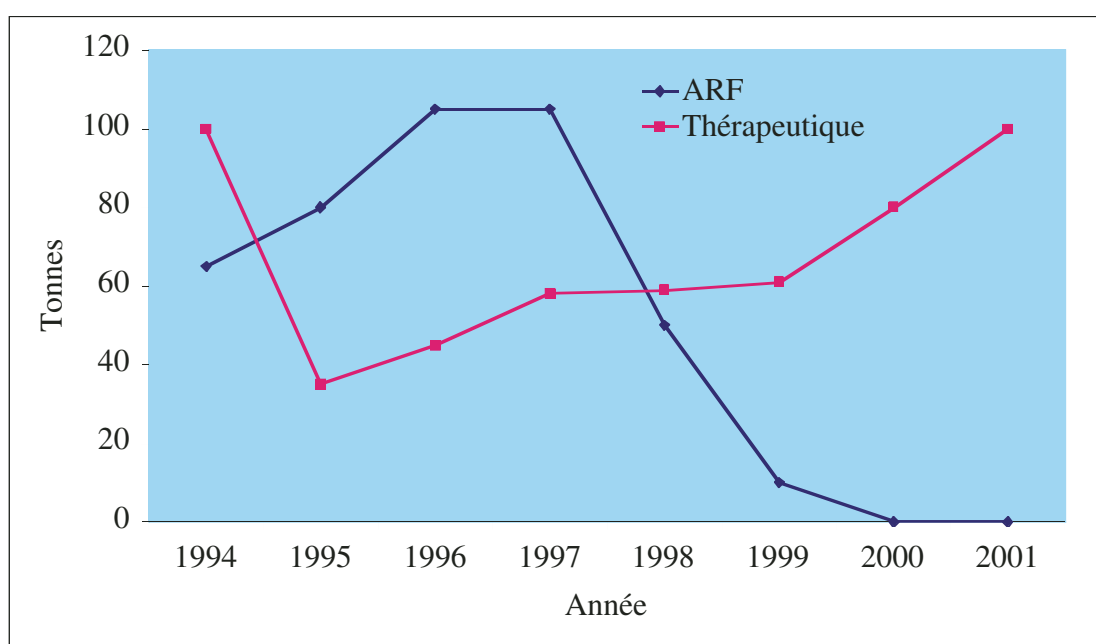


Figure 1 : Évolution de la consommation d'antibiotiques en médecine vétérinaire au Danemark (DANMAP 2002).

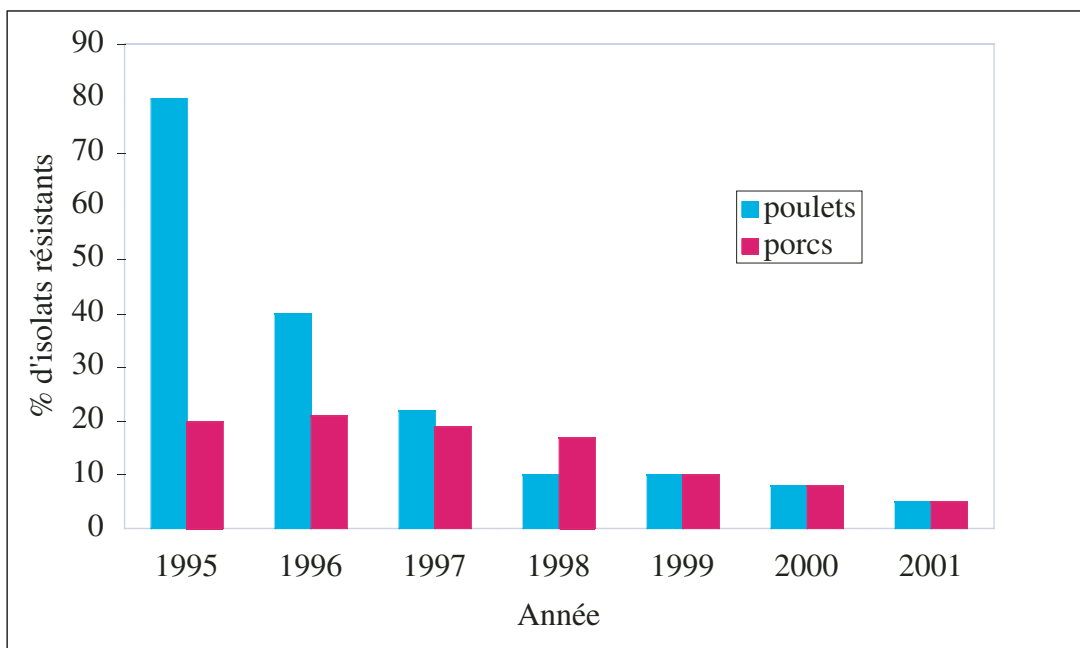


Figure 2 : Évolution de la résistance d'*Enterococcus faecium* à l'avoparcine (DANMAP 2002).

ANTIBIOTIQUE	1999	2000	2001
Aminosides	20,35	23.87	26.33
Pénicillines	30.16	31.30	29.86
Colistine	30.64	31.43	32.29
Quinolones	10.10	6.98	5.39
Tétracyclines	263.84	281.72	269.36
Macrolides	35.82	43.15	54.48
TMP-sulfa	110.90	117.33	99.60
Divers	13.07	15.60	15.66
TOTAL	514.88	551.39	532.97

Tableau 1 : Évolution de la consommation d'antibiotiques chez le porc, en France depuis la réduction de l'usage des ARF (quantités consommées en tonnes, d'après MOULIN, 2003).

Impact des déjections animales sur la dissémination de bactéries résistantes dans l'environnement

L'impact réel des épandages sur la dissémination de bactéries résistantes dans l'environnement est mal connu. Des travaux danois récents établissent cependant que des gènes de résistance peuvent être trouvés dans des bactéries du sol, avec une fréquence variable selon que des

épandages de lisier de porcs ont été ou non récemment réalisés. Dans une étude portant sur 72 souches de bactéries appartenant au groupe de *Bacillus cereus* isolées du sol et 12 souches isolées à partir du lisier, la recherche des gènes de résistance à la tétracycline n'a permis de trouver que 3 isolats porteurs du transposon Tn916 transférable à d'autres bactéries à gram positif [1]. Une comparaison plus précise des bactéries isolées d'un sol sur lequel on avait épandu du lisier de porc ou d'un sol témoin a été

réalisée en 2003 par la même équipe [8]. La résistance à la streptomycine et aux macrolides n'est que faiblement affectée. Le niveau de résistance aux tétracyclines augmente après l'épandage. Bien que ce phénomène soit temporaire, il indique que l'usage du lisier de porc peut conduire à une augmentation de la résistance des sols aux tétracyclines. La présence de gènes de résistance aux macrolides dans des souches de *Bacillus cereus* habituellement indemnes isolées à partir du sol de fermes, suggère aussi leur transmission à partir d'*Enterococcus spp* ou de *Streptococcus spp* d'origine animale [4]. Le transfert des gènes de résistance est donc possible à partir des bactéries de l'environnement. Mais la prévalence du phénomène est limitée et, ainsi que concluent les auteurs de ces travaux, le risque pratique pour la santé publique est mineur en comparaison du transfert de gènes et de bactéries résistantes par le biais de la chaîne alimentaire.

Rôle de l'eau dans la transmission de gènes de résistance

L'eau peut être contaminée par des bactéries résistantes intestinales animales et humaines porteuses de gènes de résistance, suscitant des interrogations sur les possibilités de transfert de ces résistances ultérieures aux bactéries intestinales humaines. Un scénario pessimiste verrait ces bactéries hydriques saprophytes franchir la barrière de potabilisation se multiplier dans les réseaux de distribution, entrer dans le tube digestif humain, transférer des gènes de résistance à la flore intestinale résidente pathogène ou saprophyte et excréter massivement ces bactéries intestinales résistantes (Lesne).

La contamination des eaux de surface et des eaux de rivière par des bactéries d'origine animale est évidemment plus probable dans les zones où sont concentrés les élevages : ruminants, mais surtout monogastriques (porcs et volailles) et plus encore peut-être poissons. Avec ces derniers, les traitements sont en effet administrés dans l'eau et ultérieurement rejetés dans l'environnement avec la flore digestive pathogène ou non ayant fait l'objet d'un contact récent et parfois massif avec des antibiotiques.

Les travaux permettant d'alimenter la réflexion sans sombrer dans un alarmisme plus ou moins fondé sont peu nombreux. Une étude intéressante a été réalisée en Bretagne sur la circulation hydrique des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'alimentation en eau potable du réseau du Goélo [3]. Les eaux ont été prélevées dans deux rivières, le Gouet et le Leff qui drainent des bassins versants caractérisés par la présence d'élevages intensifs, moins denses cependant dans le Gouet que dans le Leff. Les phénotypes d'antibiorésistance ont été suivis chez les entérocoques et les *Aeromonas* mésophiles. Les souches d'entérocoques étaient pour la plupart résistantes à un antibiotique au moins et en majorité multirésistantes, étayant l'hypothèse d'une dissémination de souches intestinales résistantes dans l'environnement aquatique. Par contre, les souches d'*Aeromonas* appartenaient au

phénotype sauvage, sensible à tous les antibiotiques testés excepté les β lactamines, en totalité dans le Gouët et en grande majorité dans le Leff. Les gènes de résistance à la tétracycline et au chloramphénicol, qui sont portés par des éléments génétiques mobiles, et fréquents chez les entérocoques des deux rivières, n'étaient présents que dans quelques souches d'*Aeromonas*, mais seulement dans le Leff. Les résultats indiquent donc que le transfert par conjugaison ou transduction des gènes de ces résistances des entérocoques aux *Aeromonas* est possible mais rare.

Ces résultats nécessitent d'être confirmés, mais ils tendent ne plaident pas en faveur de la fourniture en continu de gènes d'antibiorésistance à la flore intestinale humaine par l'eau de boisson *via* la microflore aquatique (par exemple les *Aeromonas*).

COMMENT RÉDUIRE LE RISQUE LIÉ À L'USAGE DES ANTIBIOTIQUES EN ÉLEVAGE SUR L'ENVIRONNEMENT ?

La réduction du risque commence bien sûr par la mise en place d'autres moyens que l'antibiothérapie pour contrôler les maladies infectieuses des animaux d'élevage.

La méthode la plus élégante est l'éradication : lorsque les maladies disparaissent, il en va de même des besoins thérapeutiques. Cette voie doit être privilégiée, mais elle n'est bien entendu pas toujours possible. La circulation des bactéries en élevage peut être limitée par la vaccination, moyen préventif qui doit être appliqué chaque fois qu'un vaccin est disponible. Elle doit l'être aussi par le respect des bonnes pratiques d'élevage : pratique de la bande unique, qualité des nettoyages et désinfections pratiqués avant l'entrée de toute nouvelle bande d'animaux, respect strict des mesures d'isolement des élevages et des règles de biosécurité. La rupture des cycles infectieux par la réduction du mélange des animaux est une mesure très efficace. En élevage porcin, le fait d'engraisser les animaux du sevrage à la vente sans déplacer ni mélanger les animaux s'avère d'une efficacité remarquable sur le plan sanitaire. L'assouplissement administratif des règles de réaménagement des locaux, permettant de vulgariser cette méthode, serait une mesure intéressante. Enfin, la gestion de la quarantaine, qui évite l'introduction de nouveaux agents pathogènes, est également une mesure essentielle, largement prise en compte dans chaque type de production par les vétérinaires spécialisés.

Tous les facteurs permettant de réduire les stress auxquels sont soumis les animaux sont importants : il a en effet été démontré que le stress peut à lui seul induire l'émergence de résistances, en l'absence de tout traitement antibiotique [6].

Le suivi vétérinaire des élevages fait désormais l'objet de toutes les attentions des pouvoirs publics, avec l'obligation de mettre en place dans tous les élevages, d'un

registre où sont enregistrés toutes les interventions et tous les traitements. La délivrance des antibiotiques sur ordonnance est effective depuis plusieurs années. Le registre d'élevage présente l'avantage de synthétiser toutes les interventions et d'être à la disposition de tous les intervenants de l'élevage, ce qui est précieux lorsque plusieurs vétérinaires sont amenés à intervenir.

PERSPECTIVES ET VOIES DE RECHERCHE

De nombreuses questions restent sans réponse et nécessiteraient de plus amples investigations.

Les premières portent sur la signification des enquêtes de prévalence, car le sujet est si large qu'il nécessite d'être bien cadré :

- Qu'entend-on exactement par milieu naturel ?
- Quelles sont les sources d'émission de substances actives et de leurs métabolites ? Les animaux sont bien connus, mais il en existe certainement beaucoup d'autres.
- Qui suit la résistance ? De nombreuses équipes de médecins, biologistes, vétérinaires, travaillent sur le sujet, mais comment co-ordonner et synthétiser les multiples travaux qui sont produits sur ces sujets ? Les résultats peuvent être contradictoires et il est indispensable de hiérarchiser les données et les risques qui semblent émerger.
- Que suit-on exactement ? Faut-il suivre une espèce bactérienne particulière, intéressante à la fois par son importance médicale et sa large dissémination dans l'environnement, comme c'est le cas des salmonelles ou des colibacilles ? Faut-il s'intéresser à des gènes de résistance particulier, comme ceux qui induisent la résistance à la vancomycine, aux quinolones, aux céphalosporines ou à d'autres familles d'antibiotiques ? Faut-il suivre l'évolution des taux de résistance et, dans ce cas, il faut bien entendu disposer de références en partant des réseaux existant et en les rendant de plus en plus complets et opérationnels.

Mais les interrogations qui peuvent être soulevées vont bien au-delà :

- Quel est l'impact des concentrations très faibles d'antibiotiques et de leurs métabolites actifs sur les bactéries des eaux, des boues et des biofilms ? Les travaux sur les antibiotiques facteurs de croissance ont partiellement abordé ce sujet, mais en prenant surtout en compte l'environnement particulier de la flore digestive. Le rôle des supports particuliers que sont les boues et les biofilms sont encore mal explorés.
- Quelle est la nature des transferts de gènes qui se produisent *in situ* dans les différents écosystèmes, entre agents pathogènes et / ou saprophytes ?
- Quel est l'impact des désinfectants et des conservateurs sur la résistance ? D'une façon plus générale, il

faut s'interroger sur les interactions de divers facteurs environnementaux : stress, qu'il s'agisse du stress bactérien ou du stress des êtres vivants exposés à des bactéries résistantes, traitements physiques et chimiques des eaux et des boues qui peuvent modifier la survie des bactéries, les taux de mutation, la sélection des souches résistantes et leur capacité à échanger des informations génétiques.

CONCLUSIONS

En dépit des interrogations soulevées par le sujet, de nombreux moyens d'action sont de prime abord disponibles. L'utilisation des substances antimicrobiennes en médecine humaine et vétérinaire sont les mieux connues. Elles peuvent faire l'objet de restrictions ou de contrôles permettant de réduire une première pression de sélection. Il ne faut cependant pas oublier les autres facteurs de sélection, allant des produits phyto-sanitaires aux désinfectants ménagers, en passant par des contaminants divers de l'environnement comme les métaux lourds sans oublier le traitement des animaux de compagnie, rarement évoqué mais vecteurs efficaces d'une diffusion rapide et rapprochée de bactéries pathogènes résistantes, en particulier à l'enfant...

L'impact de l'élevage sur la circulation de gènes de résistance dans l'environnement est important. Les pays européens ont pris la mesure du problème en restreignant les possibilités d'utilisation des anti-infectieux. Il ne faut cependant pas oublier que les résistances préexistent à tout nouvel antibiotique et que les interdictions ne protégeront jamais totalement de ce phénomène. Des niveaux de résistance importants peuvent être trouvés sur des bactéries isolées dans des élevages où aucun traitement antibiotique n'est utilisé [2]. Il apparaît donc impératif de chercher pourquoi et dans quelles conditions apparaissent ces résistances apparemment sans lien avec des facteurs de sélection connus. S'il est important d'évaluer le risque il l'est plus encore de le gérer, aussi bien chez l'homme que chez les animaux.

Références bibliographiques

- [1] AGERSO Y., JENSEN L.B., GISKOV M., ROBERTS M. C. The identification of a tetracycline resistance gene tet(M), on a Tn916 like transposon, in the *Bacillus cereus* group. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, **214**, 251-256.
- [2] BELLOC C., LAM Dinh Nam, PERON V., CARIOLET R., LAVAL A. Antibiorésistance et élevages porcins à faible niveau d'utilisation d'antibiotiques. *Journées de la recherche Porcine en France*, 2003, **35**, 415-418.
- [3] DELERY L., MINET J., MOREL S., LESNE J. Antibiotic resistance monitoring of enterococci and mesophilic aeromonads in rivers Gouët and Leff (Brittany- France) : impact of antibiotic use in animal husbandry. *FEMS 1st Congress of European Microbiology*, Ljubiana, SLOVENIE, 2003.
- [4] JENSEN L.B., AGERSØ Y., SENGELOV G. Presence of *erm* genes among macrolide-resistant Gram-positive bacteria isolated from Danish farm soil. *Environment International*, 2002, **28**, 487-491.
- [5] LU K., ASANO R., DAVIES J. Antimicrobial resistance gene delivery in animal feeds. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, **10**, 679-683.
- [6] MATHEW A., ARNETT D. B., CULLEN P., EBNER P.D. Characterization of resistance patterns and detection of apramycin resistance genes in *Escherichia coli* isolated from swine exposed to various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, **89**, 11-20.
- [7] MOULIN G., ROUX S. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2001. Rapport AFSSA-ANMV, 2003.
- [8] SENGELOV G., AGERSO Y., HALLING SORENSEN B., BALODA S. B., ANDERSEN J. S. and Jensen L.B. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environment International*, 2003, **28**, 587-595.

INTÉRÊT DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET DES BIOTECHNOLOGIES POUR LA DÉTECTION ET LE DÉNOMBREMENT RAPIDE DES MICRO-ORGANISMES

Yves Levi
Université de Paris XI

La détection, l'identification et le dénombrement des microorganismes dans l'environnement sont indispensables pour les contrôles sanitaires, mais également dans bien d'autres domaines comme, par exemple, pour la prévention des corrosions, la réduction des phénomènes de colmatages, pour le suivi des procédés industriels d'épuration des eaux usées ou potables ou encore pour les recherches en écologie microbienne.

Dans de très nombreux cas, la rapidité de réponse est un élément majeur pour l'aide à la gestion et la prise de décisions dans des délais les plus compatibles avec les niveaux d'urgences nécessaires.

Dans l'environnement, les microorganismes se trouvent dans des matrices parfois très complexes lorsqu'ils sont fixés à des particules ou à la surface des matériaux, en libre circulation dans un fluide complexe ou inclus dans des biofilms avec leurs masses d'exopolymères.

Les méthodes de biologie moléculaire apportent des éléments totalement nouveaux en terme de spécificité, de rapidité ou d'aide à l'imagerie et ont fait franchir des étapes nouvelles en terme d'acquisition de la connaissance, d'élaboration de systèmes de surveillance, d'aides à la gestion ou dans le développement de méthodologie de dépistage des situations à risques. Si ces nouvelles technologies analytiques, associant la chimie et la biologie, rendent des services extraordinaires, elles présentent des limites, des incompatibilités et des voies prometteuses de progrès.

OBJECTIFS DE L'ATELIER

Les débats ont eu pour objectif de dresser un état des capacités des outils nouveaux issus des méthodes de biologie moléculaire et des biotechnologies pour répondre aux besoins très importants de la détection rapide des microorganismes dans l'environnement et identifier les priorités d'action.

En préambule, il est rappelé que les microorganismes environnementaux sont généralement recherchés, identifiés et dénombrés :

- pour des besoins de suivi et d'amélioration de procédés industriels de production ou de traitement (efficacité de désinfection, mesure de l'activité de biodégradation ou de biotransformation...),
- pour la détection précoce d'agents pathogènes ou pathogènes opportunistes,
- pour l'identification de l'origine d'épidémies,
- pour des besoins spécifiques comme le prévention des corrosions, les études scientifiques sur l'écologie bactérienne...

ÉLÉMENTS À PRENDRE EN COMPTE

La rapidité des progrès accomplis dans le développement des méthodes analytiques issues de la biologie moléculaire ou des biotechnologies leur fait attribuer des avantages ne correspondant pas toujours à ce qu'espèrent certains utilisateurs n'ayant pas, au préalable, clairement identifié les caractéristiques de leurs besoins. C'est pourquoi, pour éclairer les débats, certains éléments ont du être rappelés pour éviter les confusions.

- La diversité des **microorganismes**, celle de leur état de viabilité ou d'infectiosité sont grandes dans l'environnement et les questions posées aux analystes ou aux chercheurs sont très variables. Ceci implique qu'il convient de se garder de généraliser sur les usages de la biologie moléculaire et de considérer ces outils comme des méthodes universelles. Bactéries, spores de bactéries, virus, protozoaires, kystes de protozoaires, champignons et spores, cyanobactéries sont autant de cibles potentielles dont les structures, les comportements et les écologies peuvent être très différents. Les questions peuvent porter sur l'identification d'une espèce au sein d'une population, le dénombrement d'une flore mixte, l'étude des échanges entre espèces au sein d'une biomasse, la détection rapide d'un germe viable, la comparaison de souches pour des études épidémiologiques...

Le demandeur sera donc amené à bien définir l'objectif attendu et les microorganismes cibles avant d'orienter vers des méthodes traditionnelles ou plus innovantes.

- La **rapidité** est d'autant plus nécessaire que les microorganismes à rechercher sont susceptibles de provoquer un risque sanitaire humain et / ou vétérinaire (eau potable, aérosols pouvant contenir des légionelles, boues avant épandage, irrigation par des eaux recyclées, risque terroriste...). Le suivi d'un procédé industriel peut également nécessiter une mesure en temps quasi réel pour permettre des réglages et le contrôle qualité en ligne (eau potable, agro-alimentaire, eau ultra-pure en industrie électronique...). Les attentes des analystes ou des décideurs en terme de délai de réponse sont variables selon les besoins et peuvent se caractériser par une mesure en ligne sur site à l'aide de capteurs, jusqu'au travail effectué en laboratoire et pour lequel est en général exigé un délai de réponse avant la fin d'une journée de travail, soit dans les 5 à 6 heures compte-tenu de l'acheminement des échantillons.

Il est donc très important qu'avant le choix d'une méthode, soit clairement défini le délai réel de réponse attendu, incluant le prélèvement, l'acheminement éventuel, les contraintes d'extraction ou de purification de l'échantillon.

- La **spécificité** est une caractéristique importante des méthodes de biologie moléculaire et elle peut être indispensable pour la recherche des espèces ou des genres particuliers, notamment lorsque l'on analyse une flore complexe. Par contre, elle peut être moins importante pour des usages globaux comme par exemple dans le cas de l'évaluation d'un procédé de désinfection sur la flore microbienne totale.

- La mesure de la **viabilité** des microorganismes est véritablement un élément décisionnel majeur, puisque la réponse attendue est généralement interprétée pour connaître la capacité du (ou des) microorganisme(s) à proliférer, agir, dégrader, modifier ou infecter. Il est donc absolument impératif que les demandeurs sachent parfaitement définir le niveau de leur exigence en matière de mesure de la viabilité. Les microorganismes peuvent être dans un état

cultivable comme le révèlent les cultures sur milieux liquides ou solides des techniques traditionnelles de la microbiologie. Ils peuvent être définis dans un état viable mais non-cultivables lorsqu'une activité biologique spécifique d'une cellule vivante est mesurée alors que les germes ne cultivent pas sur milieu nutritif. L'analyste comme le demandeur doivent être parfaitement en phase afin que l'interprétation des analyses ne puisse prêter à confusion et que la détection d'un fragment de génome dans l'environnement par des techniques de biologie moléculaire ne puisse être identifiée, en absence de méthode complémentaire, comme la détection garantie d'un germe viable.

- La **quantification** est très souvent indispensable. Dans certaines situations, et afin de limiter les coûts du contrôle, des méthodes dites « présence/absence » plus simples et moins coûteuses, basées sur des cultures en milieux solides ou liquides, sont utilisées en alternance avec des techniques quantitatives. Les limites de détection et de quantification sont des éléments majeurs lorsque la dose infectieuse est parfois due à un très faible nombre de microorganismes. Quelle que soit la méthode employée, les échantillons environnementaux nécessitent souvent que les microorganismes d'intérêt soient isolés de leur matrice et les méthodes employées sont souvent source de variabilité importante sur la mesure. C'est par exemple le cas pour le décrochage de biofilms par des techniques de grattage ou d'ultra-sons, l'isolement de virus dans des eaux ou la récupération de bactéries après filtration sur membrane.

- Les **interférences** sont parfois majeures lorsque les microorganismes sont recherchés dans des matrices complexes (biofilms, boues, sédiments, sols...) ou présents en très faibles quantités ou dispersés (air, eau...). Il importe donc de procéder à une vérification complète de la qualité de l'analyse en terme de rendement d'extraction, de variabilité, de reproductibilité de limite de détection ou de quantification dans les matrices réelles.

- Le **lieu de travail** est aussi un élément important qui entrera dans l'orientation du choix des méthodes à employer. On ne travaille pas avec les mêmes outils et la même qualité sur le terrain ou en laboratoire. Les outils modernes devraient couvrir la gamme allant du capteur en ligne autonome avec ses contraintes électriques, d'entretien et d'environnement jusqu'à l'analyseur de laboratoire en passant par les outils optiques ou les logiciels d'assistance aux opérateurs.

- Le **coût** est très variable selon les méthodes, les outils et les réactifs employés. Une fois le cahier des charges parfaitement établi, il arrive que le coût analytique soit alors jugé trop important ce qui peut alors limiter la stratégie d'échantillonnage. Les avantages, apportés au décideur par les méthodes modernes et rapides, sont partiellement limités par le faible nombre d'échantillons analysés.

LES DIFFÉRENTES MÉTHODES

- Généralement, les protocoles impliquent des étapes d'extraction et de concentration des microorganismes à partir du compartiment environnemental. Ces étapes sont très importantes dans la mesure où elles permettent de se débarrasser de contaminants ou d'interférents et d'isoler les cellules mais elles induisent également de nombreux problèmes. À titre d'exemple, les rendements de récupération sont parfois faibles, le stress de la filtration peut inactiver ou tuer les cellules et l'imagerie est parfois gênée par les matériaux supports sur lesquels se trouvent les biomasses. Les microorganismes sont recueillis par filtration, par centrifugation, par grattage de surfaces, par adsorption sur poudre de verre, etc. Il est souvent nécessaire d'associer une méthode particulière d'extraction-concentration à un type de protocole analytique, ce qui complique les actions de normalisation et nécessite des travaux d'inter-calibration entre laboratoires de référence.

- Les méthodes traditionnelles de culture en milieux liquides ou solides restent les seules à pouvoir donner une réponse de la cultivabilité des microorganismes, c'est à dire de la viabilité et de la capacité à se multiplier dans les conditions de culture employées. Elles permettent de réaliser des dénombrements de colonies, d'unités formant plaques, ou d'obtenir un dénombrement statistique basé sur la méthode du nombre le plus probable. Ces techniques traditionnelles sont encore largement employées en raison de leur efficacité, leur simplicité et leur coût, mais les réponses obtenues sont strictement limitatives au type de milieu employé et au mode d'incubation fixé et ne permettent pas d'évaluer le nombre de microorganismes viables mais non cultivables. Elles peuvent être utilisées pour réaliser des enrichissements préalables à l'utilisation de méthodes de biologie moléculaire. Des systèmes automatiques de détection ont été développés en mesurant par des voies enzymatiques ou physico-chimiques l'apparition d'un paramètre qui reflète la prolifération du ou des germes qui étaient recherchés. Ces appareils sont basés sur des variations de pH, de couleur, de turbidité ou de fluorescence, mais le temps nécessaire à l'apparition du signal est lié à la quantité de germes présents initialement dans l'échantillon et la vitesse de doublement de la culture, ce qui nécessite un délai de réponse souvent entre 8 et 10 heures minimum.

- Observations microscopiques directes ou après marquage. Ces méthodes consistent à observer directement les microorganismes par microscopie traditionnelle, en épifluorescence ou par laser confocal directement par l'opérateur ou avec l'aide de systèmes de vidéo observation ou d'analyse d'image automatisés. Les réactifs employés peuvent être non spécifiques et marquer l'ensemble des organismes, par exemple en colorant les membranes ou en se fixant sur l'ADN. Ils peuvent être spécifiques en utilisant des anticorps poly ou monoclonaux ou des sondes moléculaires ciblant des portions plus ou moins grandes du génome ou des fractions d'ARN

messenger ou ARN ribosomal (FISH). Certains réactifs permettent une estimation de la viabilité en marquant spécifiquement des réactions biochimiques uniquement détectables lorsque le métabolisme cellulaire est actif. C'est par ce moyen que sont dénombrés les germes viables mais non cultivables.

- Les méthodes de biologie moléculaire par PCR, RT-PCR, FISH, PCR en temps réel, comparaison des génomes... Toutes ces méthodes ont en commun de cibler une portion cible du système génétique et de sa transcription dans les cellules avec une spécificité souvent très importante. Elles sont utilisées pour des tests de « présence absence », en imagerie, en cytométrie, en mesure semi-quantitative ou quantitative. La réponse peut être exprimée en nombre de cellules mais sans indication de la viabilité, même si dans certains cas expérimentaux des corrélations peuvent être établies.

- Dénombrement des microorganismes marqués par cytométrie en flux ou cytométrie sur solide. Ces méthodologies utilisent des détecteurs capables de compter des événements. Les cellules sont généralement marquées et passent, dans un flux liquide, devant un détecteur dans le cas de cytométrie de flux. Il est possible également de compter des événements fluorescents par balayage d'un faisceau laser sur un filtre ou une surface solide.

Les réactifs utilisés sont donc basés sur :

- des anticorps permettant de marquer plus ou moins spécifiquement les organismes sans notion de viabilité,
- des sondes moléculaires pouvant être très spécifiques mais sans notion de viabilité garantie actuellement,
- des réactifs enzymatiques pouvant refléter l'activité biochimique et la viabilité,
- des réactifs chimiques se fixant sur des composés de la cellule sans notion de viabilité.

CONCLUSIONS DE L'ATELIER ET LISTE DES PRIORITÉS

Les discussions ont permis d'établir un ordre de priorités en terme de besoins pour les actions à mener, afin de pouvoir progresser dans la détection rapide des microorganismes tout en permettant d'obtenir des réponses fiables, précises et interprétables.

Priorité 1 : Améliorer et optimiser les méthodes de préparation des échantillons

L'échantillonnage mal réalisé induit obligatoirement des résultats faux ou mal interprétés. Généralement, l'échantillonnage est mené sur la base d'une enveloppe financière, plutôt que sur une réelle stratégie basée sur un protocole statistique avec un nombre suffisant d'échantillons répartis selon des contraintes d'espace et de temps. La

limitation, liée au coût des analyses, conduit à des échantillonnages réduits, ce qui limite le traitement statistique des données.

L'extraction des microorganismes est un facteur limitant pouvant augmenter les coûts, induire des variabilités de mesure considérables, inactiver et tuer les microorganismes et provoquer des faux positifs ou négatifs. La concentration et la purification sont également des étapes majeures d'interférences et de perturbations.

Il est important de progresser dans la mise au point de méthodes de concentration couvrant la plus large gamme possible de microorganismes et permettant un rendement le plus proche de 100%.

Sans un échantillonnage rigoureux et une préparation de l'échantillon de qualité, l'analyse n'a pas lieu d'être, même avec des techniques modernes très fiables et très précises.

Priorité 2 : Savoir éviter les interférences analytiques et les effets de matrice

Essentiellement dans le domaine des techniques de biologie moléculaire, mais aussi pour toutes les méthodes d'imagerie, les interférences avec des composants de la matrice environnementale conduisent à de faux résultats. Les discussions ont permis d'établir que les outils actuellement disponibles sont assez performants pour les attentes des laboratoires sur des microorganismes isolés en conditions favorables de laboratoire, mais sont largement limitées sur des échantillons environnementaux issus de matrices complexes. Il est donc indispensable de réaliser des progrès dans les méthodes de préparation des échantillons ou dans l'efficacité des réactifs pour que leur cible soit clairement marquée dans tous les cas (eaux usées, biofilms, déchets...)

Priorité 3 : Les outils pour l'acquisition des données existent mais ne sont pas encore appliqués en routine et dans les situations de terrain

Des outils existent actuellement soit sous forme de prototype ou de systèmes commercialisés ou en début de commercialisation.

Les microscopes ont fait des progrès considérables : microscopie confocale, force atomique, épifluorescence...

Les outils de PCR quantitative dits « temps-réel » se développent et le coût des appareillages est en diminution.

Les logiciels d'analyse d'image sont de plus en plus performants.

Des cytomètres en flux ou sur surface sont commercialisés.

Les puces à ADN se développent et peuvent être réalisées à façon.

Malgré cela, tous ces systèmes restent d'un usage de diagnostic et de recherche dans des laboratoires de pointe et

ne sont pas encore entrés dans le domaine de l'utilisation de routine pour le contrôle sanitaire.

Malgré les divers prototypes ayant été annoncés, il n'existe aucun capteur en ligne commercialisé.

Seul un analyseur en ligne en mode séquentiel est commercialisé pour la détection des coliformes dans l'eau.

Priorité 4 : Rendre les coûts acceptables pour les utilisateurs potentiels

Les laboratoires de microbiologie disposent souvent de moyens réduits par rapport à des unités de chimie organique souvent équipées de chromatographes dotés en détection de spectromètres de masse. Il faut donc pouvoir mettre en relation l'offre et la demande.

Le marché est réparti selon trois types de besoins :

- donner à un grand nombre de laboratoires dispersés sur le territoire national des méthodes fiables et d'un coût de revient limité pour le déroulement des analyses de routine,
- centraliser des laboratoires de référence dans quelques sites principaux du territoire métropolitain et DOM-TOM, utilisant des appareillages sophistiqués et très coûteux mais pouvant rassembler de nombreux échantillons,
- installer des analyseurs et des capteurs sur sites.

Priorité 5 : Développer l'assurance qualité et la normalisation pour améliorer la fiabilité des mesures

De nombreuses méthodes nouvelles apparaissent dans les laboratoires mais leurs applications pour des prestations analytiques de surveillance et de contrôle nécessitent des étapes de diffusion de l'information, de normalisation et d'intercalibrations.

Il existe actuellement des méthodes traditionnelles employées dans des laboratoires de référence et accrédités donnant un résultat interprété à la bactérie ou à l'unité près alors que la variabilité sur la mesure est connue comme étant très importante.

Pour une méthode nouvelle il s'écoule près de 10 ans entre sa découverte et son intégration dans tous les laboratoires de contrôle.

Les outils nouveaux, même s'ils offrent des résultats de grande qualité et très prometteurs lors des essais, ne peuvent logiquement se développer qu'après une période de validation et d'intercalibration. Avant d'introduire de nouvelles méthodologies analytiques dans des objectifs de contrôle réglementaire, les participants reconnaissent qu'il serait déjà important de bien intercaler les méthodes existantes, d'évaluer les caractéristiques des nouvelles techniques. L'introduction de nouveaux paramètres microbiologiques dans les réglementations

ne devrait se faire qu'après avoir vérifié la validité et les limites des méthodes préconisées.

CONCLUSIONS

La méthode idéale, capable de mesurer avec précision un microorganisme donné, sa viabilité et son infectiosité dans n'importe quelle matrice environnementale, n'existe pas et les étapes préliminaires de préparation des échantillons sont très importantes avant d'aborder l'utilisation de méthodes issues de la biologie moléculaire et des biotechnologies.

La rapidité d'analyse peut être obtenue mais sans que la réponse n'offre de précision sur certaines des caractéristiques des organismes détectés. Le choix des méthodes doit donc se faire par un dialogue préalable entre le demandeur et l'opérateur afin d'éviter que l'interprétation des résultats ne soit sujette à divergences.

Pour couvrir le champ de tous les microorganismes, ces méthodes ont fait franchir un pas important, mais elles ne savent pas encore résoudre tous les problèmes pour savoir, à un coût acceptable, dénombrer des microorganismes dans des matrices diverses avec une fiabilité acceptable tout en sachant donner une estimation de la viabilité des cellules détectées.

Les méthodes immunologiques donnent le sentiment de ne plus progresser. Les outils d'imagerie et de biologie moléculaire existent et sont importants mais la limitation de leur usage vient des interférences dues aux matrices et à l'absence de détermination de la viabilité.

L'interprétation sanitaire liée aux notions d'indicateurs va nécessairement devoir évoluer avec l'apport des informations liées aux nouvelles méthodes issues de la biologie moléculaire, mais actuellement le contrôle sanitaire repose encore sur les méthodes traditionnelles de culture.

COMMENT ASSURER LA MAÎTRISE DES RISQUES ASSOCIÉS AUX MICRO-ORGANISMES QUI SE DÉVELOPPENT DANS LES EAUX CHAUDES ?

MICROORGANISMES AQUATIQUES THERMOPHILES ÉVALUATION DU RISQUE LIÉ À *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

Philippe Hartemann

Faculté de médecine de Nancy I

Le réchauffement des eaux, liés aux phénomènes climatiques, conduit à s'interroger sur une éventuelle augmentation du risque infectieux dans des pays tempérés comme la France. La réflexion doit utiliser les connaissances actuelles sur le danger et les risques liés aux microorganismes thermophiles dans des pays où la température des masses d'eau est plus élevée, et dans les situations de réchauffement artificiel des eaux comme les rejets des activités produisant de l'énergie.

Le danger est lié à des bactéries pathogènes (ex. *Legionella*, *Pseudomonas*...), des protozoaires (*Naegleria*...), maintenant bien connues, mais probablement aussi à des bactéries opportunistes (*Afipia*, *Bosea*...) ou à des virus récemment décrits (Minivirus) et retrouvés au sein d'amibes, souvent elles-mêmes non pathogènes. Il y a de toute évidence un grand intérêt à la co-culture d'amibes pour surveiller la qualité des eaux, puisque certains microorganismes sont plus souvent inclus dans celles-ci que planctoniques. Ainsi les numérations de *Legionella pneumophila* dans certaines eaux chaudes seront fort différentes selon que l'on considérera les bactéries libres ou celles présentes dans les amibes (ex une centaine de *Legionella* par *Hartmanella*).

Ce danger doit être étudié de façon approfondi car, par exemple, *Legionella pneumophila* est beaucoup plus virulente que d'autres espèces de *Legionella*, certaines d'entre-elles, sinon la majorité étant non pathogènes (« paix aux *Legionella* de bonne volonté dans les biofilms » !). *L. pneumophila 1* est elle-même rencontrée dans plus de 85% des infections et il y a, à l'intérieur de ce sérotype, des bactéries plus virulentes que d'autres, sans que l'on connaisse à ce moment les raisons de ces différences.

Ainsi l'évaluation du risque doit se faire selon une démarche scientifique classique et non de façon empirique comme cela a été le cas jusqu'à maintenant. Les réglementations et les contrôles devront prendre en compte ces différences liées au danger et non être fixés pour un genre en général. Par exemple l'évaluation du risque lié à une tour aérofrigérante conduira à des résultats tout à fait différents selon que l'on prend comme base *Legionella pneumophila 1* ou une *Legionella* non pathogène. Or la réglementation actuelle vise l'ensemble des *Legionella*, et peut conduire à « l'éradication » de « braves » Legionelles qui pourraient être un facteur protecteur contre la colonisation par d'autres plus dangereuses !

ÉPIDÉMIE DE LÉGIONELLOSE DU NORD-PAS-DE-CALAIS

MISSION NATIONALE D'APPUI

GESTION DU RISQUE SUR LES CIRCUITS DE REFROIDISSEMENT : QUELS CONSTATS

Michèle Merchat
Climespace

Au cours de l'épidémie de légionellose dans le Nord-Pas-de-Calais (86 malades dans un rayon de 14 km, 17 décès), de nombreux circuits de refroidissement ont été suivis et / ou expertisés. L'observation sur plusieurs sites a permis de détecter des concentrations en légionelles supérieures à 10^5 ufc/l.

- L'arrêté préfectoral de 1999 était respecté dans ses termes.
- Le guide de bonnes pratiques publié par les ministères était connu.
- Le carnet de suivi était conforme aux prescriptions.
- Les propriétaires de circuits de refroidissements par voie humides ou les exploitants avaient un contrat de partenariat avec une société de traitement d'eau et dans certains cas, le constructeur des tours faisaient des contrôles réguliers.
- Un prélèvement pour analyse de légionelles était réalisé au moins une fois par an ou parfois une fois par trimestre.

Néanmoins, l'observation attentive de différents systèmes de refroidissement et des conditions mises en œuvre pour gérer le risque a permis de faire quelques constats étonnants qui permettent de mieux identifier les axes de progrès qui restent à définir.

MANQUE DE CONNAISSANCES SUR « LA VIE DES BÊTES »

Le personnel exploitant et les propriétaires de circuit de refroidissement manquent de connaissance et de compréhension sur les mécanismes conduisant à la prolifération des éléments biologiques dans les installations notamment sur la formation de biofilm. La prise en compte efficace du risque dépend directement de cette connaissance.

D'ailleurs, malgré la connaissance du guide de bonne pratique (lecture trop rapide peut être), des défauts clairement identifiés comme favorables à la prolifération des légionelles, sont oubliés. Le risque est uniquement gérer sur la base de traitements chimiques abondants en négligeant l'aspect environnement. Ainsi, il a été possible de constater de très nombreuses fois des conditions favorables à la formation et à la prolifération de biofilm :

- **une mauvaise conception** avec de nombreux bras morts, aucun accès sur les tours permettant l'observation des organes internes, des matériaux dont la surface détériorée favorise la formation de dépôts biologiques.
- **une mauvaise gestion du circuit** avec des vitesses de circulation très faibles (régime laminaire, gestion des marches / arrêts du circuit ou d'une partie du circuit...).

SOUS ÉVALUATION DU RISQUE

Généralement, différentes sociétés extérieures interviennent sur les installations, chacune remplissant son propre cahier des charges. Aucune ne prend réellement en compte le risque sanitaire. Or la mise en œuvre d'actions préventives devrait être réalisée aux regard de certaines actions susceptibles de générer un risque. La gestion du risque passe alors par la présence d'au moins une personne coordonnant l'ensemble des interventions au regard du risque, qu'elle appartienne à la société exploitante ou à l'une de ses prestataires.

STRATÉGIE DE TRAITEMENTS CHIMIQUES NON EFFICACE

L'introduction d'un biocide dans le circuit est la plupart du temps considéré comme une action de nettoyage et désinfection. Cette confusion autour de ces deux termes entraîne la mise en œuvre de moyens inefficaces pouvant

même lorsque ces opérations se déroulent à l'arrêt, entre le circuit potentiellement plus « dangereux » au moment de sa remise en service. De plus, d'une manière générale, seule la tour est considérée comme l'élément à l'origine du risque de prolifération et elle seule fait l'objet d'un nettoyage mécanique lors d'un arrêt. Aucune autre surface en contact avec l'eau n'est nettoyée avant désinfection.

Les traitements biocides sont par contre toujours systématiques, fréquents et abondants.

Certains biocides utilisés sont pourtant incompatibles avec la qualité de l'eau du circuit (chlore à pH=9) voire même, lors d'injection simultanée de deux biocides, leur incompatibilité annihile l'action biocide désinfectante. Il apparaît évident que des connaissances sur l'efficacité des biocides dans des conditions réelles d'utilisation font défaut, les études étant généralement réalisées en laboratoire dans des conditions non représentatives de la réalité d'exploitation et de ses contraintes propres.

Très souvent les conditions de mises en œuvre sont inadaptées (nettoyage chimique en choc, dosage de l'oxydant résiduel au point d'injection...), les appareils d'injection des produits pourront être sous dimensionnés (volume du brominateur, pompe doseuse).

Trop fréquemment les indicateurs de suivi de l'efficacité des biocides ne sont pas définis et / ou inadaptés et / ou pas exploités.

Dans tous les cas, des actions préventives sont mises en œuvre seulement selon un calendrier (injections hebdomadaires, mensuelles) et non au regard des dérives des paramètres de contrôles ou du risque réel (conditions favorables à la prolifération des légionelles ponctuellement réunies dans l'installation, intervention sur le réseau augmentant le risque...).

ABSENCE DE CONTRÔLE DE L'EFFICACITÉ DES MOYENS MIS EN ŒUVRE

Les prélèvements pour analyses biologiques et physico-chimiques sont rarement effectués sur un point représentatif de l'eau en circulation.

Concernant l'analyse des légionelles, les résultats définitifs sont fournis par le laboratoire dans un délai de 10 à 12 jours alors que des résultats provisoires sont pourtant une aide précieuse à la gestion du risque. En outre, quelques annotations sont faites sur le bulletin d'analyse sans que l'exploitant ne sache les interpréter (présence de flore abondante, limite de détection < 1000 au lieu de 100 pour l'ancienne version de la norme Afnor...).

Le carnet de suivi qui devrait être un outil quasi pédagogique obligeant les intervenants à mieux comprendre le risque microbiologique est dans tous les cas un simple classeur dans lequel s'accumulent des résultats d'analyses non interprétées, le plus souvent incomplet et dans lequel ne figurent ni les actions préventives et curatives ni

les paramètres cibles à contrôler.

La tenue du carnet de suivi a même été défini par écrit comme étant « une garantie face aux exigences réglementaires » la notion de risque sanitaire n'y est pas abordée.

CONCLUSIONS

Les propriétaires et les personnes qui exploitent ce type d'installations génératrices d'un risque pour la santé publique, doivent être formés au risque biologique.

Les traitements préventifs et curatifs ne pourront être adaptés efficacement qu'à la condition que des notions soient assimilées par l'exploitant et le propriétaire des tours, à propos :

- du comportement des micro-organismes dans l'eau,
- des conditions de mise en œuvre nécessaires et en particulier la nécessité de nettoyer toutes les surfaces en contact avec l'eau dans l'installation.

La sous-traitance de ce problème n'est pas remise en cause puisqu'elle permet de s'appuyer sur des compétences pointues, toutefois, le propriétaire d'un tel système se doit de s'assurer que les moyens mis en œuvre sur son installation réduisent le risque au minimum.

Ce constat signifie aussi que les sociétés compétentes dans le traitement de l'eau industrielle améliorent leur connaissance sur l'efficacité des biocides dans des conditions représentatives de la réalité avant de les proposer.

Les sociétés d'exploitation se doivent de davantage coordonner les actions mises en œuvre par les différents intervenants sur le circuit (maintenance, traitement d'eau...).

Cette recherche de la réduction maximale du risque légionelle oblige à la remise en cause importante des pratiques ou des habitudes d'exploitation des circuits de refroidissement, ce que devrait mieux comprendre le propriétaire des installations afin qu'il donne les moyens pour mener à bien ce travail.

Concernant le risque de dissémination des légionelles dans l'environnement *via* les tours aéroréfrigérantes, le propriétaire ou l'exploitant ne peuvent que veiller au respect des conditions de fonctionnement définies par le constructeur de la tour (débit d'eau, vitesse d'air, pression au niveau des diffuseurs d'eau) et à la propreté des éléments constitutifs de la tour. Toutefois, la conception des tours pourrait elle aussi évoluer pour permettre une meilleure accessibilité (accès au dessus de la tour, contrôle visuel des parties internes). Les matériaux utilisés ne sont pas toujours les moins favorables à la formation de biofilm (béton, bois). Dans certains cas, ce choix semble incontournable, mais des conseils d'entretien devraient alors être clairement définis à l'exploitant afin d'éviter que les surfaces ne se détériorent dans le temps rendant la gestion du risque plus délicate encore.

Enfin, un travail reste à fournir en matière de réduction du risque de dissémination d'aérosols contaminés. La quantité d'eau entraînée au sommet de la tour est évaluée selon le pourcentage d'eau en circulation dans la tour.

Il n'y a à ce jour, aucune connaissance sur la quantité et la taille des gouttes entraînées, qui sont pourtant « les » éléments de risque.

SYNTHÈSE DE L'ATELIER : COMMENT ASSURER LA MAÎTRISE DES RISQUES ASSOCIÉS AUX MICRO-ORGANISMES QUI SE DÉVELOPPENT DANS LES EAUX CHAUDES ?

France Wallet
EDF-Gaz de France

INTRODUCTION

Le réchauffement des eaux lié aux phénomènes climatiques conduit à s'interroger sur une éventuelle augmentation du risque infectieux dans des pays tempérés comme la France. La réflexion doit utiliser les connaissances actuelles sur le danger et les risques liés aux micro-organismes thermophiles dans des pays où la température des masses d'eau est plus élevée, et dans les situations de réchauffement artificiel des eaux comme les rejets des activités produisant de l'énergie.

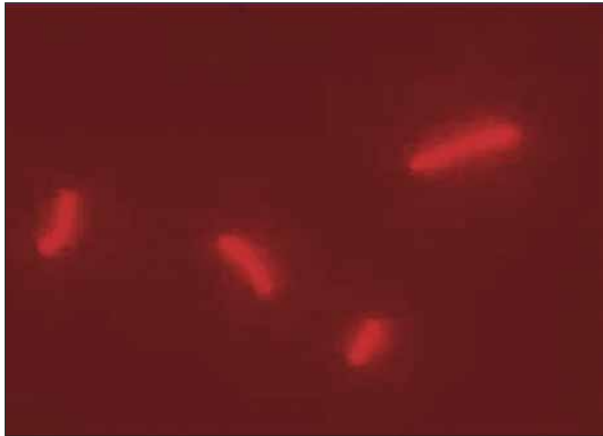
Le danger est lié à des bactéries pathogènes (ex : *Legionella*, *Pseudomonas*...), des protozoaires (*Naegleria*...) maintenant bien connus, mais probablement aussi à des bactéries opportunistes (*Afipia*, *Bosea*...) ou à des virus récemment décrits (Mimivirus) et retrouvés au sein d'amibes, souvent elles-mêmes non pathogènes. Il y a de toute évidence un grand intérêt à la co-culture d'amibes pour surveiller la qualité des eaux, puisque certains micro-organismes sont plus souvent inclus dans celles-ci que planctoniques. Ainsi les numérations de *Legionella pneumophila* dans certaines eaux chaudes seront fort différentes selon que l'on considérera les bactéries libres ou celles présentes dans les amibes (une centaine de *Legionella* par *Hartmanella*).

Pour gérer des risques, encore convient-il de pouvoir les évaluer. Mais l'évaluation du risque doit se faire selon une démarche scientifique classique et non de façon empirique comme cela a été le cas jusqu'à maintenant. Les dangers microbiens (bactéries, virus, parasites, etc.) sont assez bien connus, même si pour des pathogènes émergents les connaissances scientifiques sont encore trop limitées. En revanche, les expositions sont parfois difficiles à estimer, et les fonctions dose-effet, dose-réponse sont très mal connues. En conséquence, il est souvent difficile de proposer des valeurs limites pour guider la gestion. Malgré tout, il est nécessaire que les réglementations et les contrôles prennent en compte les différences liées au risque réellement évalué et ne soient pas fixées en général.

Les risques qui ont été traités dans cet atelier sont les risques associés aux légionelles et aux amibes.

LE PROBLÈME DE LA LÉGIONELLE

Cette problématique de l'adaptation des mesures de gestion du risque à son évaluation est particulièrement illustrée par le risque lié à la présence de *Legionella pneumophila* dans les panaches des tours aérofrigérantes, cette question étant compliquée par la difficulté de la



« *Legionella pneumophila* » après marquage par un anticorps fluorescent (exemple d'un marquage rouge). Cette légionelle est ensuite détectée et dénombrée par une technique originale de cytométrie, nouvelle méthode de détection en moins de quatre heures, sans passer par la mise en culture des bactéries (Ref. *Le Journal du CNRS* mai 200 et *Communiqué de Presse* du 2 avril 2004).

métriologie de cette bactérie dans l'air. Les différentes présentations sur ce sujet ont bien illustré cette difficulté sur un sujet d'actualité, alors qu'il apparaît sur le plan des constatations épidémiologiques que ce risque semble plus important que celui lié aux eaux chaudes sanitaires.

Généralités

Pour commencer, rappelons quelques points essentiels sur la légionellose.

La légionellose est une infection respiratoire aiguë due à *Legionella*, bactérie du milieu hydrique, dont la croissance est favorisée par une température variant de 25 à 45 °C.

L'infection peut prendre deux formes :

- Une infection aiguë bénigne appelée fièvre de Pontiac, guérissant spontanément sans traitement en 2 à 5 jours.
- Une infection aiguë pulmonaire grave, pouvant entraîner le décès dans un peu plus de 15% des cas, appelée maladie du légionnaire. L'infection survient 2 à 10 jours après l'inhalation d'un aérosol d'eau contaminée. En 2003, 1 044 cas de légionellose ont été déclarés à l'Institut de veille sanitaire (1 021 en 2002) soit une incidence de 1,7 cas pour 100 000 habitants. La légionellose est une maladie soumise à déclaration obligatoire aux autorités sanitaires depuis 1987.

L'espèce *Legionella pneumophila* est beaucoup plus virulente que d'autres espèces de *Legionella*, certaines d'entre elles, sinon la majorité étant non pathogènes. *L. Pneumophila 1* est elle-même rencontrée dans plus de 85% des infections et il y a, à l'intérieur de ce sérotype, des bactéries plus virulentes que d'autres, sans que l'on connaisse à ce moment les raisons de ces différences.

Les principaux réservoirs de germes connus pouvant être à l'origine de cas de contaminations humaines sont les tours aérorefrigérantes humides et l'eau chaude sanitaire.

De nombreuses actions ont déjà été engagées dans le domaine de la lutte contre la légionellose par les pouvoirs publics depuis 1977. De nombreuses épidémies surviennent chaque année en France et dans d'autres pays du monde. Néanmoins, les épisodes épidémiques récents montrent les difficultés à évaluer et à maîtriser ce risque. En particulier, l'épidémie survenue fin 2003 / début 2004 dans le Nord-Pas-de-Calais a marqué les esprits de par son importance, la difficulté à trouver son origine et ses conséquences économiques (fermeture définitive de l'usine incriminée).

Épidémie du Nord-Pas-de-Calais

L'épidémie de légionellose qui a sévi à Lens de novembre 2003 à janvier 2004 est la plus importante décrite en France (86 cas dont 17 décès ont été recensés du 5 novembre 2003 au 22 janvier 2004) et c'est l'épidémie qui couvre le territoire géographique le plus vaste (cercle de rayon de 12 km).

Plusieurs équipes ont été mobilisées sur cette épidémie, une mission d'appui nationale a été créée avec des membres d'instances nationales (InVS, Ineris) et d'industries (EDF-Gaz de France et Climespace) afin de déterminer l'origine de l'épidémie. Devant les données épidémiologiques et les résultats des prélèvements environnementaux et cliniques, l'entreprise N a été incriminée.

Plusieurs hypothèses ont été émises quant à l'installation à l'origine de cette épidémie :

- Les tours aérorefrigérantes : c'est une source connue d'épidémie et la modélisation de la dispersion atmosphérique des émissions des tours de réfrigération en fonction des données météorologiques est compatible avec les zones d'habitation des cas. Toutefois, les taux de légionelles retrouvés dans l'eau des tours pendant la deuxième vague d'épidémie expliquent difficilement la courbe épidémique.
- Les nettoyeurs à haute pression : en effet les opérations de nettoyage de ce type provoquent des aérosols pouvant être contaminés par les éléments nettoyés. Ces opérations, menées du 8 au 17 décembre, ont été mises en cause pour expliquer les cas survenus lors de l'arrêt des tours aérorefrigérantes.
- La lagune : le site est équipé d'un système complexe de traitement des eaux avec notamment une lagune de 2 600 m² équipée de 4 aérateurs de surface. Les prélèvements effectués à partir de janvier dans cette lagune montrent des concentrations en souche épidémique variant de 10 à 100 millions d'UFC par litre. Des prélèvements dans l'air ont montré des concentrations importantes à l'aplomb de la lagune et à 300 m sous le vent. Le rôle de la lagune comme source de contamination directe des personnes, bien que non décrit, a donc été évoqué.

Retour d'expérience des sites visités

Lors de la recherche de l'origine de l'épidémie du Nord-Pas-de-Calais, une trentaine de sites avec tours aéroréfrigérantes ont été inspectés et de nombreux prélèvements ont été effectués. Lors de cette expertise, il est apparu que les consignes nationales étaient connues et respectées (arrêté préfectoral, guide des bonnes pratiques, carnet de suivi) mais en parallèle, il existait de fréquents dépassements du seuil réglementaire de 10^5 UFC/l.

Le travail de terrain a pu mettre en évidence certaines lacunes dans l'évaluation et la gestion de ce risque associé aux tours aéroréfrigérantes, dues en grande partie à des manques de connaissance à tous les niveaux :

- Au niveau microbiologique, un manque de connaissance du risque de contamination du circuit et des conditions favorables à la prolifération.
- Au niveau du fonctionnement des tours, un manque de connaissance des paramètres favorisant la dissémination.
- Au niveau du traitement de l'eau, un manque de connaissance des moyens de contrôle de l'efficacité des traitements mis en œuvre, de la signification des paramètres indicateurs et des actions correctives à mettre en œuvre.

Cette expérience a montré combien il est important d'avoir une vision globale du risque. En effet, même si c'est la tour aéroréfrigérante qui va disséminer les aérosols et être éventuellement à l'origine de cas de légionellose, c'est

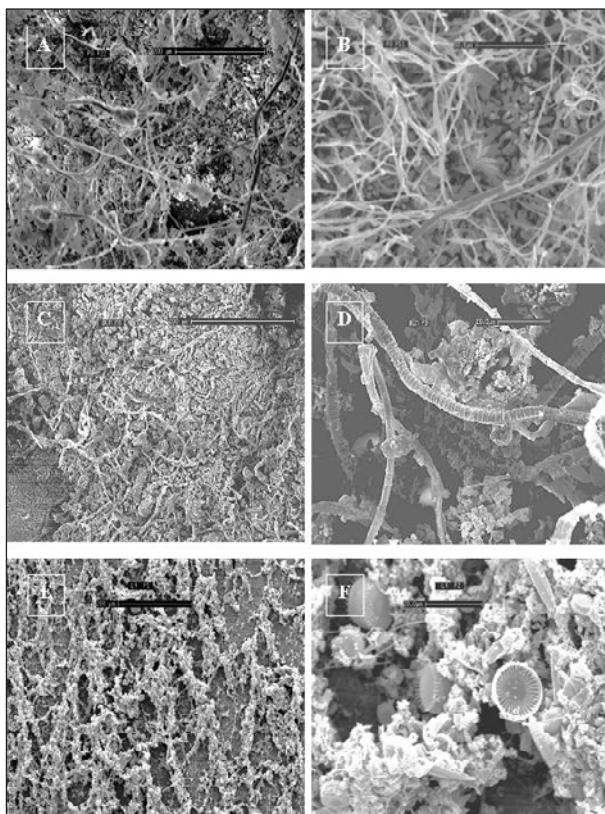
dans le circuit de la tour que se développe la bactérie. C'est donc tous les niveaux du circuit qui doivent être examinés et pris en compte dans l'évaluation du risque et pas uniquement la tour aéroréfrigérante.

Il est indispensable d'intégrer dans l'évaluation et la gestion du risque l'ensemble des éléments de l'installation et notamment :

- Les éléments de conception pouvant favoriser la formation du biofilm : présence de bras morts, matériaux détériorés, l'absence d'accès sur la tour empêchant l'observation et le nettoyage.
- Les éléments de fonctionnement de la tour pouvant favoriser le développement du biofilm : écoulement laminaire, absence de nettoyage de l'ensemble de l'installation.
- Les éléments pouvant influencer l'efficacité du traitement : efficacité intrinsèque du produit, compatibilité avec la qualité d'eau du circuit, conditions de mises en œuvre du traitement (mode et lieu d'injection des produits, dimensionnement de l'installation de traitement, adaptation des périodes de traitement aux périodes à risque), prise en compte des contraintes d'exploitation, existence éventuelle d'interaction entre les différents produits de désinfection utilisés, état de propreté des circuits. Des confusions existent également entre les termes de nettoyage et de désinfection.

Le suivi de l'état sanitaire de l'installation est sous-tendu par l'existence d'indicateurs de suivi adaptés et correctement analysés. Par exemple, il existe une forte variabilité du résultat d'analyse *Legionella* du fait du lieu de prélèvement qui peut être non représentatif de l'eau en circulation, de comparaison de résultats provenant de laboratoires différents mais sur des échantillons différents et donc incomparables, de la présence de biofilm fragilisé par les traitements successifs et inefficaces qui recontamine ponctuellement et de façon aléatoire l'eau du circuit. Une gestion globale du suivi de l'installation doit se faire par des personnes compétentes connaissant les différents éléments cités plus haut et ayant une bonne connaissance de l'installation. Malheureusement, le plus souvent ce suivi fait intervenir sur site de nombreuses sociétés avec des contrats indépendants, chacun remplissant correctement son cahier des charges mais sans qu'il y ait de vision ni de gestion globale de l'ensemble.

On constate qu'il y a manifestement une mauvaise connaissance des circuits de refroidissement et une mauvaise exploitation des textes de recommandation. Le carnet de suivi de l'installation préconisé par le guide de bonnes pratiques *Legionella* et tours aéroréfrigérantes est connu et existe. Mais il est le plus souvent incomplet, sans interprétation des paramètres mesurés, sans procédures définissant des actions correctives. Dans la plupart des cas, sa tenue est définie comme une garantie face aux exigences réglementaires, la notion du risque sanitaire en est totalement exclue. Ce carnet ressemble à une accumulation de bulletins d'analyses qui s'empilent.



A et B : coupons de packing après 185 jours d'exposition.
C et D : coupons de béton après 103 jours d'exposition.
E et F : coupons de laiton après 40 jours d'exposition.

En l'état actuel des choses, le risque sanitaire est non maîtrisé, les impacts sur l'environnement des traitements inefficaces sont importants avec risque de sélection de souches résistantes aux traitements biocides.

Dans la gestion du problème il y a une nécessité forte d'impliquer tous les opérateurs du site, de responsabiliser et former tous les intervenants : traiteurs d'eau, concepteurs, installateurs et exploitants (un groupe de travail « formation » piloté par le ministère de l'industrie a d'ailleurs été créé et a pour mandat la rédaction d'un référentiel de formation), d'intégrer le risque légionelles au métier d'exploitation des circuits de refroidissement.

Une nécessaire évaluation des risques sanitaires

Au niveau réglementaire, on peut noter que la gestion du risque est différente selon les pays : la législation actuelle en France impose deux seuils, un seuil d'action et un seuil d'arrêt respectivement égaux à 10^3 et 10^5 UFC/l les mêmes seuils sont égaux à 10^2 et 10^3 en Grande-Bretagne et 10^5 et 10^6 aux États-Unis montrant la grande diversité des approches face à ce problème et les besoins encore importants de connaissances et de l'évaluation de ce risque selon une démarche scientifique en fonction des diverses installations à risques.

Il est nécessaire que la législation intègre tous les aspects du sujet afin de diminuer le risque sanitaire sans toutefois avoir un impact négatif excessif sur l'environnement. Elle devrait se baser sur une démarche formelle d'évaluation des risques qui fait une synthèse de toutes les connaissances scientifiques sur le sujet.

Par exemple, l'évaluation du risque lié à une tour aéro-réfrigérante conduira à des résultats tout à fait différents selon que l'on prend comme base *Legionella pneumophila* I ou une *Legionella* non pathogène. Or, la réglementation actuelle vise l'ensemble des *Legionella*, et peut conduire à « l'éradication » de « braves » *Legionella* qui pourraient être un facteur protecteur contre la colonisation par d'autres plus dangereuses. Le remède serait alors pire que le mal.

Peu de chose existe en terme d'évaluation des risques microbiologiques, une méthode a toutefois été récemment développée à l'Université de Nancy. Cette démarche, encore pleine d'incertitudes, est la première réalisée jusqu'au bout sur le risque légionelles et donne une estimation en terme de nombre de malades potentiels.

Si l'on applique cette nouvelle méthode aux résultats d'une modélisation de la dispersion atmosphérique des légionelles retrouvées autour de la lagune de l'entreprise N incriminée dans l'épidémie du Nord-Pas-de-Calais, l'ordre de grandeur du résultat est parfaitement compatible avec l'épisode épidémique.

Un réel besoin de connaissance

En résumé, la gestion du risque repose sur des mesures de conception et de maintenance des tours aéro-réfrigérantes de type prévention de la croissance bactérienne et limitation de l'aérosolisation. Elle ne doit pas passer par un traitement à outrance : « paix aux *Legionella* de bonne volonté dans les biofilms » !

Une vision globale du risque et de tous les éléments pouvant l'influencer est nécessaire. Pour cela, il est indispensable :

- de pratiquer des retours d'expériences à partir d'épidémies,
- de mener des actions de recherche et l'on voit ici l'importance des services de R & D des entreprises,
- d'avoir la maîtrise de la sous-traitance qui effectue les opérations de maintenance capitale pour la gestion du risque.

Le besoin de connaissances se fait sentir en particulier dans le domaine de la métrologie des micro-organismes dans l'environnement, de l'écologie des légionelles et de connaissance de l'écosystème des circuits de refroidissement, de la relation amibes / légionelles, de la validation d'une méthode d'analyse rapide (voir atelier n° 2) en sachant que le résultat de ces analyses peut être différent de celui par la méthode culturale (présence de bactéries viables mais non cultivables).

Plan gouvernemental de prévention des légionelloses 2004-2008

La prévention de la légionellose a été inscrite dans le programme des actions nationales de l'inspection des installations classées au sein de la Drire, pour l'année 2003 (circulaire ministérielle du 30 décembre 2002). À cette occasion, plus de 3 500 contrôles bactériologiques ont été effectués. Ils ont conduit :

- Dans environ 6% des cas à observer une concentration en légionelles de plus de 10^3 UFC/l conduisant à un nettoyage de l'installation en cause.
- Dans environ 2% des cas (80 installations) à observer une concentration en légionelles de plus de 10^5 UFC/l conduisant à un arrêt de l'installation concernée pour décontamination. Des arrêtés préfectoraux d'urgence, destinés à préciser les actions à mener après des constats de dépassement du seuil de 10^5 UFC/l ont été pris dans certains cas.

Par ailleurs une circulaire aux préfets signée le 24 février était destinée à faire un recensement de toutes les tours aéro-réfrigérantes humides avant le 31 mai 2004 pour la constitution d'une base de données pour juin 2004.

Un projet d'arrêté pour une révision de la nomenclature des installations classées avec création d'une nouvelle rubrique 2921 est en cours.

Un plan d'action gouvernemental présenté lors du conseil des ministres le 7 juin 2004 vise à réduire de 50% l'incidence des cas de légionellose d'ici à 2008.

Il vise à répondre aux besoins prioritaires suivants :

- améliorer les connaissances sur la bactérie, l'exposition des personnes et la maladie,
- améliorer la prise en charge précoce des cas de légionellose et la gestion des crises sanitaires provoquées par les épidémies,
- prévenir le risque sanitaire lié aux légionelles dans les tours aéroréfrigérantes humides en maîtrisant les concentrations de légionelles dans les circuits de refroidissement et dans les panaches,
- maîtriser le risque sanitaire lié aux légionelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire intérieurs aux immeubles, les eaux minérales naturelles utilisées à des fins thérapeutiques dans les établissements de soins thermaux, et les autres installations à risque dispersant les aérosols.

UN EXEMPLE D'ÉVALUATION ET DE GESTION DES RISQUES : LE RISQUE AMIBIEN

Contexte

Parmi les amibes, une espèce, *Naegleria fowleri*, se révèle très pathogène. Elle provoque chez l'homme une maladie rare mais grave la méningoencéphalite amibienne primitive (MEAP). L'exposition se fait suite à l'inhalation d'eau contaminée lors de baignade. Elle touche plutôt les enfants et les jeunes gens en raison sans doute d'une pratique plus importante des sports nautiques et aquatiques chez ces sujets.

Ces amibes libres thermophiles se retrouvent dans des eaux naturellement chaudes ou artificiellement réchauffées comme par exemple les circuits de refroidissement des sites de production EDF. À la suite des premiers cas de méningoencéphalite amibienne primitive dans les années 1960 et 1970 (à ce jour, aucun cas n'a été répertorié en France), le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) a posé la question à EDF en 1977 du rôle possible du réchauffement des eaux lié au fonctionnement des centrales, sur la multiplication des amibes libres pathogènes.

Évaluation et gestion du risque

1/ Caractérisation de la source

Les premières analyses ont été effectuées dans le nord-est de la France entre 1979 et 1981 à partir d'eau prélevée dans le bassin déversoir de la centrale thermique de la Maxe sur la Moselle. De 1981 à 1988, les campagnes de mesure se sont poursuivies sur la Moselle et les méthodes

de mesure se sont améliorées. Les concentrations en *Naegleria fowleri* ne dépassaient pas quelques unités par litre.

De 1989 à 1992, le programme d'étude s'est étendu à d'autres centrales. La multiplication amibienne s'est avérée être essentiellement le fait des centrales à circuit fermé car les amibes ont le temps de se multiplier dans ce type de circuit, les campagnes ont donc été effectuées, au cours de cette période, essentiellement dans ces centrales et dans les fleuves en aval.

Au cours de ces années, EDF s'est aperçu que les concentrations les plus importantes étaient observées dans l'eau des circuits de refroidissement de certaines tranches de centrales. La seule particularité de ces tranches les plus contaminées était la nature de leur condenseur en acier inoxydable, matériau mis en remplacement du laiton pour diminuer les rejets de cuivre.

2/ Modélisation du risque

Parallèlement à ces mesures, EDF a réalisé une modélisation du risque sur la base de données animales expérimentales et de données humaines issues des études épidémiologiques. Le risque caractérisé a été la probabilité de contracter une MEAP lorsque l'on se baigne dans une eau contenant une concentration « c » de *N. fowleri*.

3/ Gestion du risque

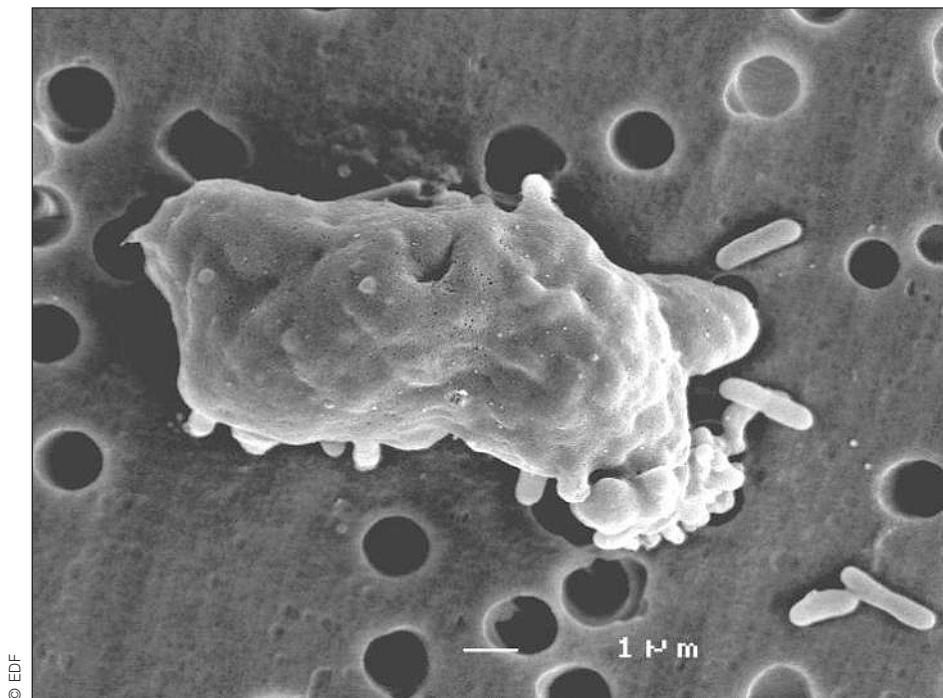
Jusqu'en 1995, les mesures de prévention prises ne concernaient que le personnel possiblement exposé à l'eau des réfrigérants.

En 1996, le programme de remplacement des condenseurs en laiton par de l'acier inoxydable posait le problème d'une augmentation du risque pour les baigneurs en aval. EDF a alors présenté le problème amibes au CSHPF tant d'un point de vue évaluation que gestion du risque. Le CSHPF a donné un avis favorable au traitement par chloration de ces types de circuits de refroidissement et a estimé que si les concentrations ne dépassaient pas 100 *N. fowleri/l* en rivière, il n'y avait pas lieu d'interdire la baignade.

EDF a dressé dès 1997 une liste des centrales à risque qui évolue progressivement en fonction du programme de rénovation des condenseurs. Aujourd'hui, le nombre de centrales impactées est de 6.

Par la suite, le traitement par chloration continue a été interdit pas les autorités compétentes en raison des rejets en dérivés organochlorés engendrés par le traitement. Actuellement, deux types de traitements sont utilisés, le traitement chimique par monochloramination de l'ensemble de l'eau du circuit pour 5 sites et le traitement physique aux UV de l'eau de purge pour 1 site.

Le programme de recherche sur le sujet continue avec des équipes universitaires reconnues et peut avoir de nombreuses retombées dans le domaine, et notamment pour la problématique des légionelles : mise au point de technique rapide de détection dans des échantillons



Amibe du genre Naegleria sous forme trophozoïte ou végétative.

environnementaux, écologie du biofilm, efficacité de différents traitements ainsi que la recherche de nouveaux traitements, influence de divers matériaux sur le développement des micro-organismes, impact du biofilm sur la détérioration des éléments constitutifs du circuit.

Retour d'expérience associé au risque amibes

Il a été convenu par l'assemblée que le risque amibien a été suffisamment anticipé pour éviter des mesures de gestion inadaptées basées sur une évaluation du risque non corrélée à une démarche scientifique.

Cette exemple démontre également la difficulté d'anticiper les conséquences d'actions visant à limiter un risque. L'exemple flagrant est le changement des condenseurs du laiton à l'acier inoxydable initialisé notamment pour limiter les rejets de sels de cuivre et de zinc dans l'eau, qui au final ont généré un risque amibien.

De plus, les mesures de gestion du risque doivent prendre en compte les conséquences de mesures préventives, ou curatives, pouvant être supérieures au risque lui-même.

Cet exemple a également démontré le rôle primordial d'unité de recherche et développement associé aux services médicaux permettant une amélioration des connaissances pour une évaluation et une gestion du risque adaptées. Malheureusement ces unités ne peuvent être présentes qu'au sein de grosses entreprises et ne sont pas en accord avec une politique de rentabilité.

CONCLUSION GÉNÉRALE DE L'ATELIER

Cet atelier, à travers deux exemples, a bien illustré le caractère indispensable d'une bonne évaluation des risques selon une démarche scientifique développée aux États-Unis pour les risques chimiques. Cette évaluation des risques fait la synthèse de toutes les connaissances scientifiques disponibles pour caractériser un risque. Seule cette caractérisation la plus précise du risque permettra de prendre les mesures de gestion adaptées sans nuire à l'environnement.

C'est pourquoi les membres de l'atelier ont préconisé des efforts de recherche significatifs dans le domaine de la métrologie des microorganismes dans l'environnement et de leur écologie, dans celui du retour d'expérience à partir d'épidémies et dans la modélisation, l'utilisation des modèles proposés pour les produits chimiques étant trop réductrice par rapport aux propriétés d'organismes biologiques. Sans ce corpus de connaissances scientifiques indispensables, la question du risque ressortira beaucoup plus souvent du principe de précaution que de celui de prévention.

Un effort est à fournir également dans la prise en compte de la dimension sociologique (perception des risques) dans la gestion des situations, notamment les situations de crises. Cette gestion ne doit pas partir en ordre dispersé mais doit privilégier une gestion globale du problème.

LISTE DES PARTICIPANTS

Mlle	Émilie	ALGROS	IRH Génie de l'environnement SA
M.	Antoine	ANDREMONT	Hôpital BICHAT
Mme	Catherine	ARFI	VEOLIA ENVIRONNEMENT
Mme	Béatrice	BOISSON	ECRIN
M.	Alexandre	BOLOTINE	INRA
Mme	Carine	BOURNY	VEOLIA ENVIRONNEMENT
Mme	Paulina	CERVANTES	AFSSE
Mme	Vanessa	COPPET	ADIV
Mme	Corinne	DANAN	AFSSA
Mme	Karine	DELABRE	VEOLIA ENVIRONNEMENT
Mme	Laure	DELERY	INERIS
Mlle	Audrey	DELONG	IRH Génie de l'environnement SA
M.	Francis	DEROUIN	Hôpital SAINT-LOUIS
Mme	Jean-Claude	DESENCLOS	Institut national de veille sanitaire
M.	Jean-Jacques	DOYEN	SUEZ
Mme	Muriel	ELIASZEWICZ	AFSSA
M.	Olivier	ESPEISSE	ELI LILLY
Mme	Joëlle	EURIN	Univ. de Paris VI (Pierre et Marie Curie)
M.	Gabriel	FESTOC	GENESYSTEMS
M.	Patrick	FLAMMARION	MEDD
M.	Luc	FOULQUIER	IRSN
M.	Christophe	GANTZER	Univ. de Nancy I (Henri Poincaré)
Mme	Inès	GIOVANNACCI	CTSCCV
M.	Alexandre	GONCALVES	SIAAP - CRITER
M.	David	GRAUSZ	GENOPOLE
M.	Laurent	GRIMAULT	AFSSA
M.	Philippe	HARTEMANN	Univ. de Nancy I (Henri Poincaré)
M.	Jean-Claude	JORET	VEOLIA WATER
Mlle	Audrey	JOUIS	ECRIN
Mme	Arlette	LAVAL	École Nationale Vétérinaire
Mme	Colette	LE BACLE	INRS
Mme	Béatrice	LECETRE-ROLAND	CNRS

M.	Christophe	LEICIAGUECAHAR	EUROFORUM
M.	Jean	LESNE	ENSP RENNES
Mme	Myriam	LEVEUGLE	ECRIN
M.	Yves	LEVI	Univ. de Paris XI (Paris Sud)
M.	Jacques	MACHEFER	CNISF
Mme	Christine	MAILLARD	JBB SANTE
Mme	Céline	MAIMARAN	VEOLIA ENVIRONNEMENT
Mme	Armelle	MARECAT	AIR LIQUIDE
Mme	Françoise	MARTZ	CYLERGIE
Mme	Michèle	MERCHAT	CLIMESPACE
M.	Pierre	MEURICE	L'OREAL
Mme	Annick	MOREAU	DANONE
M.	Christian	MOUGIN	INRA
M.	Jean-François	MUNOZ	AFSSA
Mme	Catherine	PAFFONI	SIAAP - CRITER
Mme	Nane	PÉHUET	ECRIN
Mme	Claire	POUGNARD	EDF
M.	Guy	RANDON	VEOLIA ENVIRONNEMENT
M.	Paul	RIGNY	MES-ORSAY
M.	Xavier	RIQUIEZ	Comité Nord plant de pommes de terre
M.	Sébastien	SABY	VEOLIA ENVIRONNEMENT
M.	René	SEUX	ENSP RENNES
M.	Tristan	SIMONART	Institut Pasteur
M.	Alexei	SOROKINE	INRA
Mme	Annette	TARDIEU	Univ. de Paris VI (Pierre et Marie Curie)
M.	Walter	VAN HECKE	COGEMA
M.	Daniel	VILLESSOT	SUEZ
M.	Éric	VINDIMIAN	MEDD
Mme	France	WALLET	EDF-GDF
Mme	Bénédicte	WELTE	EAUDEPARIS
Mlle	Fatima	YADANI	SIAAP - CRITER

