

Biofilm & Matériaux

des réseaux intérieurs de distribution d'eau

**Docteur
Fabien SQUINAZI**

Avant-Propos



Docteur Fabien Squinazi médecin biologiste

- biologiste assistant des hôpitaux (1975 - 1984)
- Directeur adjoint du Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris (1984 - 1993)
- Directeur du Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris (1994 - 2012)

En 1943, le microbiologiste américain **Claude Zobell** avait montré que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont bien plus nombreuses que celles en suspension dans l'eau. Mais, c'est **William Costerton**, qui a d'abord proposé, puis défendu et finalement popularisé, la notion de "biofilm", c'est-à-dire une communauté bactérienne associée à une surface.

Dans les années 1970, alors chercheur en post-doctorat à l'Université de Calgary, au Canada, **William Costerton** explore les communautés bactériennes qui peuplent les cours d'eau. Il constate que le nombre de bactéries attachées aux rochers dépasse d'un facteur 1 000 à 10 000 celui des bactéries flottant dans l'eau. Dès cette époque, il souligne que les biofilms représentent incontestablement le mode de vie normal des bactéries et le plus adapté à la colonisation d'environnements divers.

En fait, toute surface non protégée peut donner lieu à la formation d'un biofilm en présence

d'humidité ; la surface pouvant être immergée en permanence, par intermittence ou simplement se trouver dans une atmosphère humide. Cependant, certaines zones sont plus propices que d'autres à la production de biofilm : les lieux où de fortes concentrations bactériennes deviennent des sources permanentes de contamination, les interfaces ou les systèmes en écoulement qui apportent régulièrement aux micro-organismes de l'eau et des nutriments.

Dans les réseaux intérieurs de distribution d'eau, la prolifération bactérienne est essentiellement liée à la constitution d'un biofilm, qui associe des composés organiques et minéraux et des micro-organismes. Véritable réservoir microbien, qui protège les micro-organismes et concentre les nutriments, le biofilm est à l'origine de la contamination de l'eau par le détachement de fragments ou la libération de bactéries individualisées dont l'impact sanitaire peut être plus ou moins important.

La maîtrise du développement du biofilm dans les réseaux intérieurs, et par conséquent des facteurs qui facilitent ce développement, contribue donc à garantir la qualité de l'eau distribuée au consommateur et le respect des exigences sanitaires, notamment pour des établissements recevant des populations sensibles, comme les établissements accueillant de jeunes enfants, les établissements de santé ou les établissements médico-sociaux.

le sommaire

1 le Biofilm p 4 à 11

- 1.1 Définitions p 4
- 1.2 La formation du biofilm p 4

2 l'évaluation du biofilm au contact des matériaux p 12 à 51

- 2.1 Les matériaux des canalisations intérieures p 12
- 2.2 Les méthodes d'évaluation du biofilm p 13
- 2.3 Comparaison des matériaux selon les méthodes statiques p 20
- 2.4 Comparaison des matériaux selon les méthodes dynamiques p 31
- 2.5 Autres études publiées p 35

3 Les micro-organismes hydriques d'intérêt sanitaire p 52 à 63

- 3.1 *Legionella pneumophila* p 52
- 3.2 *Pseudomonas aeruginosa* et autres *Pseudomonas* p 55
- 3.3 Les mycobactéries non tuberculeuses p 58
- 3.4 La flore microbienne revivifiable p 61
- 3.5 Les *Aeromonas* p 62
- 3.6 Bactéries coliformes p 62

4 Les méthodes de lutte contre la contamination des réseaux intérieurs p 64 à 79

- 4.1 Les textes français p 64
- 4.2 La sécurité sanitaire de l'eau dans les bâtiments (OMS) p 75

5 Les méthodes de traitement de la contamination des réseaux intérieurs p 80 à 92

- 5.1 Les procédés et produits de nettoyage et de désinfection p 80
- 5.2 Les procédés et produits de traitement de l'eau p 87

Références bibliographiques p 96 à 103

- Le Biofilm p 96
- Les micro-organismes hydriques d'intérêt sanitaire p 98
- Les méthodes de lutte contre la contamination des réseaux intérieurs p 101
- Les méthodes de traitement de la contamination des réseaux intérieurs p 102

1.1 Définitions

Selon les auteurs, le biofilm peut être défini comme :

“une communauté de bactéries agrégées en microcolonies, enrobées dans une gangue qu’elles ont sécrétée et adhérent sur une surface inerte ou biologique” (Costerton *et al.*, 1978). En 1995, cette définition a été étendue à des systèmes microbiens non associés à des surfaces, des agrégats ou floculats, seulement caractérisés par une adhésion interbactérienne (Costerton *et al.*, 1995)

“des cellules immobilisées sur un support et fréquemment incluses dans une matrice de polymères extra-cellulaires” (Characklis, 1989)

“un ensemble de micro-organismes et de micro-colonies de cellules filles, associés entre eux et/ou aux surfaces et interfaces, et inclus dans une matrice constituée d’exopolymères bactériens, de matière organique et non organique, ainsi que de macromolécules piégées du milieu environnant” (Groupe Eau-Santé, 2006)

Le biofilm ne représente pas un simple assemblage de cellules microbiennes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires) déposées sur une surface. Il représente plutôt un système microbien dynamique et structuré, dans une matrice d’origine biologique, renfermant des éléments chimiques divers. L’état attaché ou sessile des cellules en biofilm est plus propice à la croissance des micro-organismes tandis que l’état libre ou planctonique des cellules en suspension dans le milieu est plus favorable à leur dissémination. L’alternance de ces deux phases permet de comprendre la persistance et la croissance des micro-organismes dans les milieux hydriques.

1.2 La formation du biofilm

Le cycle de mise en place d’un biofilm sur une surface s’effectue généralement selon trois étapes majeures (Center for Biofilm Engineering, Bozeman, Montana, EU, 2003) :

- l’adhésion des cellules bactériennes à la surface,
- la maturation du biofilm, qui correspond à la multiplication des cellules et la mise en place

d’une architecture particulière avec production de la matrice d’exopolymères,

- le détachement cellulaire permettant la colonisation de nouvelles surfaces.

Un biofilm peut être considéré comme un équilibre dynamique entre les phénomènes qui tendent à en augmenter l’épaisseur (multiplication des cellules qui le composent ou agrégation de nouveaux organismes planctoniques, en suspension) et les phénomènes qui tendent à en réduire l’épaisseur (mécanismes de détachement).

L’adhésion des cellules bactériennes à la surface

L’étape d’adhésion peut être divisée en quatre sous-étapes :

a. Mise en place d’un film conditionnant

Les molécules polymériques, organiques ou inorganiques, présentes dans un milieu aqueux, sont attirées vers les surfaces et forment le film conditionnant qui semble nécessaire pour l’adhésion des bactéries sur une surface (Palmer *et al.*, 2007). Ce film se dépose en l’espace de quelques minutes et peut être constitué de glycoprotéines, phosphoprotéines, albumines ou lipides. Il représente une source de nutriments non négligeable pour les bactéries favorisant ainsi leur chimiotactisme. Ces molécules adsorbées peuvent aussi modifier les propriétés physico-chimiques de la surface (charge électrique, hydrophobicité) permettant d’augmenter l’adhésion bactérienne. En revanche, des molécules amphiphiles tensioactives, synthétisées par certains micro-organismes, peuvent limiter l’adhésion bactérienne (Bos *et al.*, 1997)

L’influence de la rugosité moyenne de la surface est variable selon les bactéries (Vanhaecke *et al.*, 1990). La topographie de la surface peut également intervenir : plus la surface présenterait des anfractuosités (crevasses, piquûres), plus les cellules bactériennes y seraient piégées (Holah et Thorpe, 1990).

b. Transfert des cellules bactériennes vers la surface

Le transfert des bactéries vers la surface est le résultat de phénomènes de nature physico-chimique et biologique.

Plusieurs facteurs physiques peuvent expliquer ce transfert :

- les mouvements browniens ou transport diffusif ;

- la sédimentation, qui est liée à la différence de gravité entre la cellule bactérienne et le fluide dans lequel elle se trouve ;
- le transport convectif, dû aux caractéristiques hydrodynamiques du fluide environnant (régime statique, turbulent ou laminaire). Ce type de transport semble être particulièrement important pour l'attachement des cellules. Un régime d'écoulement turbulent favoriserait l'adhésion en augmentant la probabilité de la rencontre entre une cellule bactérienne et une surface.

Le facteur biologique prédominant dans la phase de transfert est la chimiotaxie. Ce système permet à la bactérie de reconnaître dans son environnement des substances chimiques attractives, dont les nutriments, ou répulsives et d'orienter son déplacement sur de courtes distances. L'activité flagellaire est alors modifiée de manière à orienter le déplacement bactérien vers les zones favorables (Pratt *et al.*, 1998). Un mutant de *Pseudomonas aeruginosa* non mobile, doté d'un flagelle incomplet, était incapable de former une couche de cellules sur des surfaces de PVC, contrairement à la souche sauvage non mutée, mobile (O'Toole *et al.*, 1998). Les auteurs imputent cette déficience à l'incapacité de la souche mutante à se déplacer vers la surface.

c. Adhésion réversible

La phase d'adhésion réversible résulte de l'interaction entre les cellules bactériennes et un substrat pour des distances globalement inférieures à 50 nm. Durant cette phase, les cellules bactériennes subissent toujours des mouvements browniens et sont facilement détachables, par exemple par des forces de cisaillement induites par la circulation d'un fluide.

Plusieurs approches physico-chimiques ont été utilisées pour décrire la phase d'adhésion réversible des bactéries à une surface, ou de bactéries entre elles.

- la théorie DLVO classique (de Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek), théorie issue de la physique des colloïdes, décrit l'équilibre entre les forces de Lifshitz - Van der Waals (attractives) et les forces électrostatiques (attractives ou répulsives) d'un système. Dans le cas d'un système d'interaction micro-organisme / substrat solide / liquide, ces forces sont représentées par les potentiels de surface zêta (ζ) des cellules bactériennes ou des substrats auxquels elles adhèrent.

Les interactions électrostatiques peuvent varier en fonction du pH et de la force ionique du fluide environnant. L'adhésion de *Pseudomonas fluorescens* au verre est ainsi favorisée en milieu acide (Fletcher, 1998). L'abaissement du pH, en réduisant la dissociation des groupements anioniques, diminuerait les forces de répulsion électrostatiques pouvant exister entre la cellule bactérienne et la surface. Une diminution de la force ionique du liquide de suspension augmente la charge négative de surface de *Bacillus subtilis* et modifie son comportement bioadhésif (Garry, 1997). La présence de cations (surfaces cellulaires, supports) favorise l'adhésion entre surfaces chargées négativement (Hermansson, 1999).

- l'approche thermodynamique fait intervenir les énergies libres de surface de tous les éléments du système : cellules bactériennes, substrat solide, liquide. Le système des surfaces en interaction (substrat/cellule bactérienne, substrat/liquide, cellule bactérienne/liquide) évolue dans le but d'atteindre une énergie libre minimale, qui favorise l'adhésion microbienne. Toutefois, cette approche néglige les forces d'interactions électrostatiques (Bos *et al.*, 1999).
- la théorie DLVO étendue a été développée par Van Oss en 1986. Plus complète que les deux premières théories, elle prend en compte plusieurs interactions non covalentes, qui peuvent être électrodynamiques (Lifshitz - Van der Waals), électrostatiques, donneur/accepteur d'électrons (acide-base de Lewis) ou le mouvement brownien. D'autres interactions stériques peuvent également être prises en compte pour modéliser l'adhésion des cellules à une surface.

Ces approches sont des modèles physico-chimiques, adaptées à l'étude de l'adsorption de particules colloïdales inertes et bien définies (formes, charges, etc.). L'adhésion de cellules bactériennes fait également intervenir d'autres paramètres biologiques qui ne sont pas pris en compte par ces théories (Hermansson, 1999) :

- l'architecture et la nature des groupements chimiques, présents à la surface des cellules bactériennes, à l'origine de leurs propriétés physico-chimiques de surface,
- la présence d'appendices (flagelles, pili,...) ou de polymères (exopolysaccharides, acides teïchoïques,...) à la surface des cellules,
- une production spécifique à chaque souche de la plupart des constituants de la paroi cellulaire et qui peut évoluer en fonction de l'état physiologique des cellules (température de

croissance, stade physiologique, milieu de croissance, ...), (Hancock, 1991).

d. Adhésion irréversible

Cette dernière phase ou consolidation correspond à l'ancrage des cellules bactériennes sur la surface et se met en place sur de courtes distances (1 à 1,5 nm). Elle se distingue de l'adhésion réversible par l'importance des forces nécessaires au détachement des cellules (grattage, nettoyages chimiques, ultrasons) (Palmer *et al.*, 2007). Des systèmes de liaisons moléculaires de faible énergie, mais nombreux, entrent en jeu dans ce processus et font intervenir des molécules produites par les cellules bactériennes elles-mêmes.

L'étude de la transition entre phase d'adhésion réversible et phase d'adhésion irréversible chez différentes bactéries révèle l'existence de plusieurs étapes.

Dans un premier temps, la proximité d'une surface est perçue par la cellule bactérienne. L'hyperpolarisation de la membrane, par accumulation d'ions à la surface de la cellule, représenterait un signal pour la cellule bactérienne, lui indiquant la proximité d'une surface (Van Dellen *et al.*, 2008).

Dans un second temps, la synthèse de facteurs cellulaires est induite, consolidant ainsi la position des cellules adhérentes sur la surface par le biais d'organites extracellulaires (adhésion des flagelles ou des pili - Austin *et al.*, 1998) et/ou, si les cellules possèdent l'information génétique et le substrat nutritif nécessaire, par la synthèse de polymères extracellulaires.

Le blocage de la synthèse des exopolysaccharides permet de diminuer très fortement la formation de biofilm dans un système contenant différentes espèces microbiennes (Cammarota *et al.*, 1998). De même, une corrélation a été mise en évidence par Mack *et al.* (1996) entre la synthèse d'un polysaccharide spécifique par certaines souches de *Staphylococcus epidermidis* et la formation de biofilm.

Certaines espèces (*Aeromonas spp.*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Rhodospirillum centenum*, *Azospirillum brasilense*), expriment, en plus de leur flagelle polaire, des flagelles secondaires latéraux dont l'expression est induite seulement à proximité d'une surface (ou en milieu visqueux) (Merino *et al.*, 2006).

Chez *Pseudomonas putida*, les gènes de biosynthèse de polysaccharides ou lipopolysaccharides,

ainsi que des gènes impliqués dans la synthèse de fimbriae, sont induits lors des étapes précoces de formation du biofilm (Sauer *et al.*, 2001).

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la protéine SadB augmente la production de polysaccharides Pel et diminue le taux de changements de rotation flagellaire, entraînant la motilité par "swarming" ou déplacement sur une surface et favorisant ainsi l'adhésion irréversible (Caiazza *et al.*, 2007).

Chez *Escherichia coli*, l'adhésion bactérienne est dépendante de la présence de pili particuliers, nommés *curl* (Saldana *et al.*, 2009).

La maturation et l'architecture du biofilm

Dans des conditions favorables, les cellules bactériennes ayant adhéré pourront se multiplier et coloniser la surface à leur disposition. La coalescence des polymères extracellulaires, produits par chaque cellule bactérienne, aboutit à la formation d'une matrice organique. L'association "matrice organique et cellules bactériennes" forme ce que l'on appelle communément un "biofilm". Ce terme laisse sous-entendre l'existence d'un "film" microbien recouvrant la surface. Bien que ce type de morphologie soit effectivement rencontré, il existe différentes architectures de biofilm telles que les "patch", les microcolonies ou les structures "en champignon".

Une fois fixées, les cellules bactériennes modifient fondamentalement leur comportement, via, notamment un second messager, c-di-GMP (di-GMP cyclique), qui a la capacité d'activer ou de réprimer l'expression de gènes lorsque la cellule bactérienne se trouve à proximité d'une surface : augmentation de la production de polysaccharides, diminution de la synthèse du flagelle, etc.

La multiplication clonale des cellules sous forme adhérente conduit à la formation de microcolonies. Puis, lorsque l'accès aux nutriments devient limité à l'intérieur d'une microcolonie, les cellules se déplacent en utilisant la motilité de surface, par le biais des pili de type IV, pour coloniser les autres espaces disponibles sur un substrat ou de nouvelles microcolonies (étude chez *Pseudomonas aeruginosa*) (O'Toole & Kolter, 1998).

Pour maintenir un bon état physiologique des cellules du biofilm, des vides ou canaux, doivent être ménagés autour des microcolonies. Ces ca-

Architecture du biofilm : les méthodes d'analyse

naux permettent la circulation de nutriments mais également d'eau et d'oxygène et jouent également un rôle dans l'élimination des sous-produits du métabolisme dont l'accumulation pourrait être nocive pour les cellules bactériennes (Donlan, 2002). L'utilisation de la microscopie confocale en temps réel a permis d'observer la circulation de microparticules de latex fluorescentes au sein de ces microcanaux, démontrant ainsi la présence d'un flux à l'intérieur des canaux (Stoodley *et al.*, 1994).

La matrice d'exopolymères est un élément crucial du biofilm. Principalement synthétisée par les cellules bactériennes, elle joue un rôle d'échafaudage pour le maintien de la structure du biofilm, mais également un rôle protecteur pour les cellules, limitant par exemple la pénétration de molécules antimicrobiennes.

Plusieurs éléments interviennent dans sa composition ; les polysaccharides et les protéines, composants majoritaires, mais aussi de l'ADN extracellulaire.


a. Polysaccharides

Les polysaccharides peuvent représenter, dans certains biofilms, 50 à 90 % de la matière organique (Vu *et al.*, 2009). Chez les bactéries à Gram négatif, les polysaccharides sont constitués essentiellement de molécules neutres ou polyanioniques, dont la charge est due aux acides uroniques ou aux pyruvates. Chez les bactéries à Gram positif, seuls quelques polysaccharides de nature polycationique ont été observés.

La nature des polysaccharides varie selon les espèces. Les biofilms de l'environnement formés de plusieurs espèces sont capables de synthétiser des polysaccharides variés venant complexifier la composition de la matrice.

La poly- β (1-6)-N-acétyl-D-glucosamine (PNAG) est un exopolysaccharide impliqué dans la cohésion du biofilm chez des nombreuses espèces à Gram négatif mais aussi à Gram positif (Ganeshnarayan *et al.* 2009).

Pseudomonas aeruginosa synthétise au moins trois types d'exopolysaccharides (Psl, Pel et alginate) impliqués dans le maintien de la structure du biofilm. L'importance de ces polysaccharides varie en fonction des souches étudiées et des conditions de culture. Les Psl, ancrés à la surface des cellules bactériennes en un motif hélicoïdal, jouent un rôle important dans l'adhésion intercellulaire et surfacique et dans la structuration

 *L'étude de la formation de microcolonies et de la structuration spatiale du biofilm s'est développée avec l'évolution des techniques de microscopie, et notamment de la microscopie confocale (Massol-Deya *et al.*, 1995 ; Davies *et al.*, 1998 ; Allesen-Holm *et al.*, 2006). Comparée à un microscope classique, la microscopie confocale permet une focalisation sur une épaisseur très fine (point focal), de l'ordre de 0,5 à 0,7 μm selon les microscopes (contre environ 10 μm pour un microscope classique). Le balayage de l'objet observé à différentes profondeurs aboutit à des coupes virtuelles de l'échantillon. L'analyse de ces coupes permet la reconstitution de structures en trois dimensions.*

De nombreux marqueurs cellulaires fluorescents sont aujourd'hui disponibles :

- **marqueurs aspécifiques** : intercalants des acides nucléiques (Syto, acridine orange, etc.)
- **détection spécifique de micro-organismes** : technique FISH (Declerck *et al.*, 2009), immunofluorescence, protéines fluorescentes (Green Fluorescent Protein, Cyan Fluorescent Protein, etc.)

*D'autres outils permettent de détecter des produits du métabolisme bactérien sécrétés (polysaccharides, protéines, ADN,...) afin de visualiser la matrice du biofilm (marquage par des lectines couplées à un fluorochrome) ou l'activité d'une population de cellules bactériennes à l'intérieur d'un biofilm (activité respiratoire, activité estérasiqye) (Sule *et al.*, 2009).*

du biofilm (Byrd *et al.*, 2009). Les Pel sont impliqués au niveau de la phase d'attachement des cellules à leur support et dans la maintenance de l'architecture du biofilm mature (Ryder *et al.*, 2007). L'alginate est surtout exprimé chez les souches mucoïdes (Parsek *et al.*, 2008). Chargé négativement, il lie les cations, notamment le calcium, qui sert de pont entre les différents polymères d'alginate.

b. Protéines - Adhésines

De nombreuses protéines sont impliquées dans la formation de la matrice du biofilm. Parmi les structures bactériennes de surface, importantes dans l'adhésion et la cohésion du biofilm, se trouvent les adhésines protéiques qui regroupent différents fimbriae et des structures non-fimbriae (Latasa *et al.*, 2006) dont des structures de type fibrilles curli produites par *Escherichia coli*.

Les protéines de type *Bap* (ou Biofilm Associated Proteins) sont des protéines de la surface cellulaire. Le gène *Bap* a été identifié chez des espèces bactériennes à Gram positif et à Gram négatif (Latasa *et al.*, 2006). Chez *Staphylococcus aureus*, cette protéine est impliquée dans l'adhésion initiale au support, mais augmente également la cohésion du biofilm par sa capacité à lier la PNAG.

Les *curli* sont des structures protéiques dont la longueur varie de 0,1 à 10 μm et la largeur de 4 à 12 nm. Ils sont principalement constitués de

la protéine *csgA*, assemblée en une structure tertiaire de type fibrille, riche en feuillets β . Peu après la découverte de *curli* chez *Escherichia coli*, des adhésines à structure amyloïde ont été décrites chez d'autres entérobactéries, mais également chez des bactéries à Gram positif, les chaplines, ou encore chez les fungi, les hydrophines.

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, les pili de type IV sont impliqués dans l'architecture du biofilm. Ces pili jouent un rôle via la motilité par "twitching" des cellules bactériennes qui permet une colo-

Conséquences pour les cellules de la fixation sur une surface

Les cellules incluses dans un biofilm développent une spécificité physiologique, notamment une résistance aux molécules antimicrobiennes et une capacité d'adaptation à des environnements hostiles. Cette spécificité peut être attribuée à une combinaison de différents mécanismes physiques, chimiques ou biologiques complémentaires.

a. Protection contre les agressions extérieures

La structure des biofilms correspond à un arrangement tridimensionnel de cellules bactériennes, de composés exocellulaires et d'espaces "vides" remplis d'eau ("water channel") (Stoodley *et al.*, 1997). L'implication de la matrice du biofilm dans les mécanismes de résistance aux agents anti-microbiens a été décrite par plusieurs auteurs (Essomba, 1996). La présence d'une couche de polysaccharides hydratés pourrait protéger les cellules de la dessiccation et constituer une barrière (ionique et stérique) pour les agents désinfectants et les antibiotiques. Cette matrice organique peut également piéger les éléments nutritifs et créer un micro-environnement favorable à la multiplication cellulaire.

La détermination des coefficients de diffusion d'une gamme de nanoparticules de référence, de tailles et propriétés physico-chimiques différentes, au sein de biofilms modèles, a permis de mettre en évidence le rôle des interactions stériques, des interactions électrostatiques et des structures locales du biofilm (en particulier des zones denses dites "en champignon") dans les phénomènes de diffusion particulaire à travers la matrice des biofilms microbiens.

b. Influence sur l'état physiologique

La physiologie des cellules bactériennes dépend des paramètres physico-chimiques du milieu environnant (diffusion de l'oxygène, pH, nutriments,...). La structure hétérogène des biofilms et le rôle de barrière de diffusion de la matrice organique contribuent à la formation de gradients chimiques (métabolites, protons), gazeux ou électriques qui vont localement influencer le micro-environnement physico-chimique, et en conséquence, l'état physiologique des cellules (Matin *et Harakeh*, 1990). Le gradient d'oxygène entre la surface et la base du biofilm joue un rôle important dans la régulation de certains gènes chez *Escherichia coli* et *Salmonella typhi murium* (Meir *et Yagil*, 1990).

Dans un biofilm, les cellules les plus superficielles ont un accès beaucoup plus "direct" aux éléments nutritifs et peuvent libérer aisément leurs déchets métaboliques dans le fluide extérieur. Ces cellules, qui présentent un taux de croissance généralement supérieur à celui des cellules présentes à proximité de la surface, seront néanmoins les plus exposées aux "agressions" du milieu extérieur tels les agents désinfectants.

c. Modification de l'expression génétique

L'adhésion d'une cellule bactérienne à une surface peut s'accompagner de profondes modifications phénotypiques des cellules. La production d'enzymes nécessaires à la synthèse d'exopolysaccharides par *Staphylococcus epidermidis* est déclenchée par l'adhésion des cellules (Costerton *et al.*, 1987). Un facteur, nommé sigma, présent chez les cellules adhérentes, permettrait de gouverner l'expression des gènes nécessaires à la formation du biofilm, et en particulier la synthèse des polymères exocellulaires (Deretic *et al.*, 1994). L'expression de 38 % des gènes des cellules d'*Escherichia coli* cultivées en biofilm par rapport à leurs homologues planctoniques, en suspension (Prigent-Combarret

nisation plus efficace de la surface. *Legionella pneumophila* exprime à sa surface plusieurs types de pili, notamment des pili de type IV (Liles *et al.*, 1998 ; Stone *et al.*, 1998).

c. Acide désoxyribonucléique (ADN)

Le rôle de l'ADN a été mis en évidence dans le maintien de la structure du biofilm jeune (moins de 84 heures) chez *Pseudomonas aeruginosa* (Witchurch *et al.*, 2002). D'autres composants que l'ADN semblent intervenir ensuite dans le

biofilm mature. La présence d'ADN dans les biofilms a également été démontrée chez d'autres espèces, dont des espèces à Gram positif (Izano *et al.*, 2008 ; Mann *et al.*, 2009).

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, il a été montré que l'ADN du biofilm était similaire à l'ADN génomique de la bactérie et qu'il était issu de la lyse d'une sous-population de cellules du biofilm (Allesen-Holm *et al.*, 2006).

et al., 1999). Cette même étude révèle que les cellules adhérentes sont exposées à des conditions physico-chimiques très différentes des cellules en suspension, et en particulier une plus forte pression osmotique, une plus faible concentration en oxygène et une plus forte densité cellulaire. L'activation de la synthèse de vingt-cinq protéines différentes a été observée pour les cellules de *Pseudomonas aeruginosa* durant les trois premières heures de contact avec la surface (Pulcini, 2000).

d. Interactions intercellulaires

Le Quorum Sensing ou comportement communautaire correspond aux communications chimiques et aux interactions intra- ou inter-espèces au sein de la communauté microbienne complexe que représente le biofilm. Ce mécanisme est lié à l'accroissement de la densité de la population bactérienne, qui conduit à l'augmentation de la concentration d'une molécule signal dans l'environnement extracellulaire. Quand la concentration en molécule signal atteint un niveau seuil, une cascade de transduction du signal est activée et induit l'expression, ou la répression, de gènes cibles. Ce phénomène entraîne donc la modification coordonnée ou "concertée" du comportement

physiologique de toute une communauté microbienne, appartenant ou non à la même espèce (Atkinson *et al.*, 2009).

Deux systèmes principaux de Quorum Sensing ont été décrits chez les bactéries, basés sur les différences du récepteur au signal :

- **le système médié par les AHL** (N-Acyl-Homosérine lactone), chez les bactéries à Gram négatif. Décrite pour la première fois chez l'espèce *Vibrio fischeri*, cette substance diffusible, produite par les cellules bactériennes elles-mêmes, permet d'induire leur fluorescence.
- **le système LuxR**, système de transduction du signal, retrouvé chez les bactéries à Gram positif et quelques bactéries à Gram négatif, médié par des peptides auto-inducteurs (AIP) (Zhang *et al.*, 2004).

Le Quorum Sensing est impliqué dans de nombreux phénomènes, comme la luminescence, la production d'antibiotiques, le transfert de plasmides, la motilité, la virulence mais aussi la formation de biofilm. Le développement d'une cellule bactérienne entraîne des modifications de son environnement ; ainsi, sa consommation et ses déchets peuvent aménager un environnement approprié au développement d'autres espèces microbiennes. Ces consortiums

microbiens ont également une plus forte résistance à des traitements de désinfection (McEldowney et Fletcher, 1987 ; Skillman *et al.*, 1997).

e. Biocorrosion des surfaces

Les cellules bactériennes jouent un rôle dans l'altération et la dégradation fonctionnelle des surfaces. Ce phénomène appelé biocorrosion des métaux est directement lié à la formation de biofilms par des bactéries sulfato-réductrices dont le métabolisme énergétique implique des mécanismes de transfert d'électrons (par exemple, *Clostridium sporogenes*). L'élément donneur d'électron (par exemple, un support métallique) est alors oxydé. D'autres micro-organismes aérobies ont été aussi incriminés dans ce processus de dégradation.

La biocorrosion ou corrosion induite par les micro-organismes est souvent caractérisée par l'attaque localisée et en profondeur de la surface métallique. On la qualifie de corrosion par piqûre ou corrosion par effet de crevasse. Les travaux récents apparentent ce phénomène irréversible à la formation de réactions électrochimiques capables de former localement une pile. Ces réactions sont amplifiées par la présence d'oxygène et de thiosulfate.

Le détachement cellulaire

Malgré les nombreux bénéfices apportés aux cellules bactériennes par l'état biofilm, le détachement s'avère nécessaire, notamment pour la colonisation de nouvelles surfaces ou lorsque les nutriments arrivent à épuisement.

Les données concernant l'étape de détachement des cellules ou d'agrégats de cellules sont encore partielles. Donlan (2002) évoque plusieurs paramètres, physiques et biologiques, intervenant dans cette étape.

Si le détachement de "cellules filles" se produit à partir de cellules bactériennes en division dans le biofilm, des forces physiques jouent également un grand rôle dans la libération des cellules. En particulier, dans un réseau d'eau, le biofilm subit des forces de frottement ou de cisaillement, induites par la circulation du fluide qui, au-delà d'un certain seuil, peuvent conduire à plusieurs types de détachement :

- l'érosion, qui décroche régulièrement de petites portions du biofilm ;
- l'"écaillage", détachement massif et rapide de gros agrégats ;

Les biofilms des réseaux de distribution d'eau

➤ L'eau d'un réseau de distribution est un milieu pauvre en constituants organiques (de l'ordre du mg/l) et hostile pour les cellules bactériennes. Les cellules libres, qui flottent au fil de l'eau, ne peuvent que survivre. Elles se transforment en minicellules sphériques de survie, nommées ultramicrobactéries ou ultramicrocellules, d'un diamètre inférieur au micromètre (Kjelleberg, 1993 ; Morita, 1997 ; Hengge-Aronis, 2000). L'insuffisance de nutriments, spécialement d'énergie, conduit les cellules bactériennes à s'adapter et se différencier (processus de "starvation-survival") : elles améliorent leur pouvoir de détection et d'utilisation des ressources nutritives disponibles, elles synthétisent des systèmes de transport alternatif et de nouvelles voies métaboliques pour assimiler de nouveaux substrats, elles produisent des protéines de stress qui leur permettent de mieux résister aux agressions de l'environnement tels que l'élévation de température, le choc oxydatif, le choc osmotique (Matin, 1992).

Tous les matériaux en contact avec une eau naturelle (c'est-à-dire une eau contenant de la matière organique et des micro-organismes) sont recouverts de dépôts organiques décrits comme film conditionnant, puis par des micro-organismes formant un biofilm. Dès la mise en eau des réseaux de distribution d'eau potable, les matériaux se couvrent assez rapidement de polymères, de nature polysaccharidique, puis sont colonisés par des micro-organismes (bactéries, fungi,... ; environ 10^7 cellules/cm²) formant à terme un biofilm irrégulier (la surface n'est jamais couverte à 100 %), peu épais (de 30 μ m à 500 μ m), visco-élastique et difficile à éradiquer.

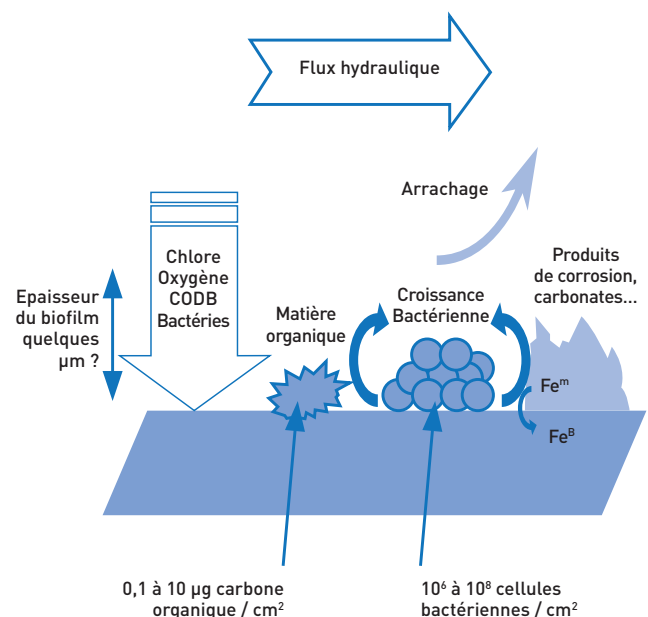


Figure 1 : schéma de quelques mécanismes réactionnels participant à l'accumulation de biofilms sur une surface en contact avec l'eau potable. (CODB = Carbone Organique Dissous Biodégradable)

Les biofilms des réseaux de distribution d'eau présentent une grande diversité de communautés microbiennes et de larges différences dans leur composition chimique (eau, polysides, protéines, acides nucléiques) et dans l'épaisseur de la matrice. Leur constitution dépend des caractéristiques

- l'abrasion, qui résulte de la collision de particules en suspension dans le fluide avec le biofilm.

Le détachement de cellules du biofilm est aussi régulé par des mécanismes biologiques, comme l'expression d'enzymes dégradant la matrice, la lyse d'une certaine sous-population de cellules ou l'activation d'un prophage (Barraud *et al.*, 2006). Des cellules de biofilm de *Staphylococcus aureus* sont libérées grâce à des protéases dont l'expression est régulée par les signaux du *Quorum Sensing* (AIP) (Boles *et al.*, 2008). La présence dans le milieu de culture de surfactants, comme

les rhamnolipides, qui diminuent les interactions adhésives, augmente significativement la libération des cellules du biofilm, par creusement des microcolonies (Boles *et al.*, 2005). Les gènes de biosynthèse des rhamnolipides sont régulés chez *Pseudomonas aeruginosa* par le *Quorum Sensing* ou bien par un manque de nutriments. Des stress oxydatifs ou nitrosatifs permettent également l'induction de la lyse et la dispersion des cellules du biofilm (Barraud *et al.*, 2006).

physico-chimiques de l'eau distribuée, des traitements de potabilisation préalablement appliqués, de la présence d'un résiduel en chlore ainsi que des conditions de distribution.

La structure des biofilms est encore mal décrite et incertaine (colonies dispersées sur la surface et/ou films de quelques micromètres) du fait de la grande difficulté à explorer sans déformer cette biomasse fixée en très faible quantité. Elle est de plus compliquée par la présence de débris, de produits de corrosion, de dépôts minéraux et par la formation de tubercules de corrosion offrant de nouvelles niches ou surfaces à coloniser.

L'état stationnaire n'est sans doute jamais atteint dans un réseau réel du fait de fréquentes discontinuités : variations du régime hydraulique, changement de la nature et de la concentration des nutriments et des désinfectants, introduction de nouveaux micro-organismes. Les résultats de Zacheus et al. (2000) montrent une accumulation lente de biomasse mais continue après 5 mois d'exposition à l'eau potable. Percival et al. (1998) observent un changement des populations bactériennes dominantes entre les "pionniers" qui colonisent un matériau acier en moins d'un mois et les espèces présentes après cinq mois d'immersion dans l'eau. Par analogie avec les concepts de différenciation des biofilms au cours de leur vieillissement, on peut estimer qu'il y a obligatoirement réorganisation constante du système biofilm au cours de son développement : formation de microagrégats, de canaux, etc.

Les biofilms hébergent transitoirement ou à long terme des micro-organismes pathogènes ou d'intérêt sanitaire. Leur origine est liée à une intrusion non maîtrisée des flux de certains micro-organismes dans le réseau d'eau via un traitement insuffisant ou défaillant, une contamination accidentelle, ou une contamination rétrograde. Un grand nombre de ces micro-organismes, du fait de leurs propriétés physico-chimiques de surface, adhèrent aux biofilms et aux parois des réseaux de distribution. Ils vont y survivre plus ou moins longtemps. L'installation à long terme de micro-organismes pathogènes ne concerne vraisemblablement que quelques groupes de bactéries ou de protozoaires.

Dans ces conditions, la contribution du biofilm, un réservoir potentiel de pathogènes, au maintien de micro-organismes potentiellement dangereux au sein du réseau de distribution d'eau doit être analysée.

Les techniques avancées de biologie moléculaire/génomique permettent de disposer d'outils moléculaires qui assurent une analyse fine de la présence de cette vaste biodiversité microbienne et apportent de précieuses informations sur les populations microbiennes impliquées dans la croissance des biofilms, la nitrification, la biocorrosion et la persistance d'agents pathogènes.

De nombreux matériaux sont utilisés pour la conception des éléments constitutifs des réseaux intérieurs de distribution d'eau. Ils ont des comportements très différents vis-à-vis de la prolifération bactérienne à leur contact et de la limitation de la croissance du biofilm, mais aussi vis-à-vis des traitements préventifs ou curatifs qui seront mis en œuvre pour réduire les risques de développement du biofilm.

Les études scientifiques disponibles sur l'évaluation du biofilm au contact des matériaux portent principalement sur des matériaux neufs. Les données relatives au comportement des mêmes matériaux après mise en situation réelle sont peu nombreuses et difficilement comparables du fait de la diversité des situations rencontrées. L'influence simultanée des caractéristiques physico-chimiques de l'eau (pH, dureté, température,...), des traitements chimiques ou de l'âge du réseau sont autant de variables qu'il est difficile de synthétiser pour obtenir un modèle prédictif universel.

Le vieillissement des interfaces eau / paroi, qui est le site préférentiel du développement des micro-organismes, pourra, à plus ou moins brève échéance, créer des conditions favorables à la prolifération microbienne, notamment par la présence de tartre ou de corrosion. Il est donc nécessaire d'appréhender et de prendre en compte, dès la conception du réseau, les caractéristiques des matériaux qui pourront influencer sur ce vieillissement afin de diminuer les risques de développement incontrôlé du biofilm dans le long terme.

2.1 Les matériaux des canalisations intérieures

La diversité des matériaux, associée à la multiplication des applications et des fonctionnalités rencontrés sur les réseaux, nécessite de bien différencier les produits dont les appellations sont parfois très proches.

Les matériaux métalliques

Le cuivre (Koper en Hollandais, Copper en anglais). Ce métal, comme le plomb (interdit depuis 1995), est historiquement l'un des matériaux les

plus utilisés dans les canalisations intérieures. Ses propriétés mécaniques et sa facilité de mise en œuvre ont permis son utilisation dès l'antiquité et son grand développement. Il est aujourd'hui fréquemment rencontré dans les réseaux intérieurs en raison de sa mise en œuvre considérée comme traditionnelle. Il présente certains inconvénients, comme une mauvaise résistance aux traitements chimiques qui conduit à des problèmes de corrosion (par exemple, traitements chlorés), une sensibilité à l'érosion générant des surfaces propices à l'entartrage.

L'acier inoxydable (Stainless Steel en anglais). Ce métal est obtenu à partir d'acier auquel l'adjonction de chrome apporte une moindre sensibilité à la corrosion. Sa résistance aux agressions chimiques est meilleure que celle de l'acier galvanisé mais dépend de la variété d'inox retenue (notamment pour les traitements chlorés) ainsi que de la mise en œuvre des produits. Dans certaines conditions, les échauffements dus aux soudures peuvent modifier la structure du métal et diminuer localement ses propriétés. La conservation des propriétés de l'acier inoxydable ne sera assurée que par une mise en œuvre précautionneuse.

L'acier galvanisé. Ce matériau est constitué d'acier sur lequel une couche superficielle (galvanisation à chaud) permet d'améliorer la résistance chimique de la paroi du matériau. Peu onéreux et de mise en œuvre aisée, ce produit a longtemps été retenu en alternative du cuivre ou de matériaux de synthèse plus coûteux. Sa grande sensibilité à la corrosion et à la température élevée ainsi qu'un état de surface favorisant l'accrochage du tartre constituent ses principales faiblesses en matière de lutte contre le développement bactérien. Son usage est aujourd'hui fortement déconseillé.

Les matériaux de synthèse

Les matériaux de synthèse ont fait leur apparition depuis quelques décennies et sont venus concurrencer les matériaux métalliques. Moins sensibles à l'entartrage, sans utilisation de flamme pour leur mise en œuvre, leurs structures très diverses leur confèrent des propriétés appréciables dans la multiplicité des applications rencontrées dans les réseaux intérieurs. Toutefois, les produits considérés ont des propriétés différentes, souvent méconnues des utilisateurs et entraînant des confusions entre les produits.

Les polyoléfines. Ces matériaux, apparus depuis une trentaine d'années, sont principalement utilisés

pour la réalisation de canalisations semi-rigides en petite distribution ou pour les réseaux de chauffage, notamment par le sol. En règle générale, leur résistance aux traitements chimiques est satisfaisante, mais des conditions de traitement sévères, notamment en cas de choc chloré ou thermique, peuvent entraîner à terme des pertes de propriétés mécaniques. Il en est de même pour la résistance de certaines polyoléfines en présence de dioxyde de chlore.

Les polyoléfines comprennent :

- **le polybutène (PB)**
- **le polypropylène (PP)**
- **le polyéthylène (PE)**. Il est utilisé uniquement en eau froide car l'augmentation de la température entraîne une perte des propriétés mécaniques.
- **le polyéthylène réticulé (PE-X ou PE-R)**
- **les matériaux multi-couches**. Ils sont constitués, en général, d'une couche interne de matériau polymère, en contact avec l'eau, d'une couche externe et d'un renfort en sandwich. Pour exemple, le polyéthylène renforcé par une feuille interne d'aluminium (Al/PE-MD). Les propriétés au regard de l'eau potable sont alors celles de la couche interne.

Les matériaux vinyliques. Cette famille de matériaux est mise en œuvre depuis les années 50 dans des applications de transport d'eau froide (PVC-U), puis pour le transport de l'eau froide et de l'eau chaude sanitaires (C-PVC).

Les matériaux vinyliques comprennent :

- **le polychlorure de vinyle non plastifié (PVC-Unplasticized, PVC-U)** : obtenu à partir de polychlorure de vinyle, sans adjonction de produits plastifiants, il s'agit d'un matériau offrant de bonnes propriétés de résistance chimique, notamment au chlore. Son domaine d'application est limité à l'eau froide car l'élévation de température entraîne une baisse des propriétés mécaniques.
- **le polychlorure de vinyle chloré (C-PVC)** : utilisable pour la réalisation de réseau d'eau chaude ou froide sanitaire, il possède une bonne résistance thermique et chimique, permettant la réalisation de traitements de désinfection au chlore.

Les matériaux souples

Ces matériaux, principalement caoutchoutiques, sont principalement utilisés pour la réalisation d'éléments d'étanchéité ou de membranes utilisées dans des vannes, des clapets ou des éléments de filtration.

Les matériaux souples comprennent :

- **le silicone**
- **le polychlorure de vinyle plastifié (PVC-P)** : obtenu à partir de polymère, auxquels sont ajoutés des quantités importantes de plastifiants qui permettent de modifier fondamentalement son comportement.
- **le caoutchouc** : plusieurs natures peuvent être rencontrées, conférant des propriétés chimiques ou mécaniques diverses (EPDM, NBR, etc.).

2.2 Les méthodes d'évaluation du biofilm

Les réglementations actuelles européenne (Directive du Conseil 98/83/EC) et française (Code de la santé publique) demandent que les matériaux au contact des eaux destinées à la consommation humaine ne soient pas susceptibles d'altérer la qualité de l'eau durant son transport, son stockage et sa distribution. La formation de biofilm sur les matériaux est une cause de dégradation microbologique de l'eau destinée à la boisson, la cuisson, la préparation des aliments ou à d'autres usages domestiques.

Dans les trois dernières décennies, des méthodes expérimentales, dites statiques ou dynamiques, ont été développées pour déterminer l'aptitude des matériaux à promouvoir la croissance microbienne. L'activité microbienne est mesurée de différentes manières selon les méthodes proposées (tableau 2-1).

Il faut souligner que les études disponibles n'ont été réalisées que sur des matériaux neufs et que l'influence des paramètres liés aux traitements et au vieillissement des réseaux intérieurs, tels que le tartre ou la corrosion, n'a pas été prise en compte. D'autres expérimentations complémentaires sont nécessaires pour évaluer dans la durée la promotion de la croissance microbienne au contact des matériaux.

Les méthodes statiques

La méthode MDOD (Royaume Uni)

La méthode de la différence en oxygène dissous (Mean Dissolved Oxygen Difference), telle qu'elle

TABLEAU 2-1 : principes des méthodes d'essai statiques proposées pour déterminer l'aptitude des matériaux à promouvoir la croissance microbienne au contact de l'eau potable

Pays	Méthode	Principe	Statut
Royaume Uni	Différence en oxygène dissous (MDOD)	Détermination dans une cuve de la consommation d'oxygène associée à la croissance des micro-organismes planctoniques et en biofilm sur le matériau test	British Standard 6920-2.4 : 2000
Allemagne	Formation d'un dépôt sur la surface du matériau (SP)	Détermination du volume du dépôt sur la surface du matériau test au contact d'un écoulement lent de l'eau du robinet	DVGW W270 : novembre 2007
Pays-Bas	Pouvoir de production d'une biomasse (BPP)	Détermination dans un flacon d'eau de la production d'ATP associée à la croissance microbienne, planctonique et en biofilm	Joint Research Programme : 1994
Autriche	Mesure de la flore bactérienne hétérotrophe et de l'ATP	Détermination de la flore bactérienne hétérotrophe et de l'ATP sur le biofilm formé dans des tuyaux remplis d'eau	Önorm B 5018 : 2002

a été décrite par Colbourne et Brown, en 1979, est devenue une méthode normalisée au Royaume Uni (BS 6920-2.4 : 2000). La consommation additionnelle d'oxygène dans l'eau est utilisée comme indicateur de l'activité microbienne du matériau testé, présent dans une cuve où l'eau du robinet est renouvelée deux fois par semaine. Le ratio Surface / Volume est de 150 cm² pour un litre. La température de l'eau est de 30 ± 1° C. La durée du test est de 8 semaines.

Les valeurs typiques vont de (0,0 ± 0,6) mg/l pour le verre (témoin négatif) à des valeurs de (7,5 ± 2,5) mg/l pour la paraffine (témoin positif). Les matériaux présentant une valeur supérieure à 2,4 mg/l sont considérés comme non acceptables pour leur utilisation au contact de l'eau destinée à la consommation humaine.

La méthode de formation d'un dépôt - SP (Allemagne)

La méthode de formation d'un dépôt sur un matériau test, développée en Allemagne (Schoenen et Scholer, 1983) est reprise dans la norme

DVGW W270 : novembre 2007. Elle utilise des plaques de matériaux ou des segments de tuyaux (surface de 800 cm²) soumis à un écoulement lent et permanent d'eau potable (20 ± 2 l/heure ou 0,4 à 4 mètres/heure pour le tuyau). La température de l'eau est de 12 ± 5° C. Le volume du dépôt sur la surface du matériau testé est utilisé comme indicateur de biofilm. Il est mesuré après centrifugation à 4, 8 et 12 semaines (16 optionnel).

Les résultats typiques vont de valeurs inférieures à 0,01 ml/800 cm² pour le verre (témoin négatif) jusqu'à plus de 15 ml/800 cm² pour la paraffine. Les matériaux présentant une valeur supérieure à (0,05 ± 0,02)/800 cm² sont considérés comme non acceptables pour leur utilisation au contact de l'eau potable.

Les méthodes MDOD et SP ont été comparées sur plusieurs matériaux PVC (Schoenen et Colbourne, 1987). A l'exception d'un matériau, les résultats des tests ont fourni la même conclusion selon le critère de définition. Des essais complémentaires utilisant une plus grande variété de matériaux n'ont pas montré le même degré de réponse.

L'étude du pouvoir de production de biomasse – BPP (Pays-Bas)

Le test BPP (Biomass Production Potential) est dérivé du test développé par Van Der Kooij et Veenendaal (1993), nommé BFP ou "pouvoir de formation d'un biofilm". Dans ce test, on utilise, comme indicateur de biomasse active, la production d'adénosine triphosphate (ATP), qui est un composé riche en énergie présent dans toutes les cellules vivantes, c'est-à-dire actives métaboliquement. Le test a été harmonisé au cours d'un projet européen CPDW (Construction Products in contact with Drinking Water) en 2000 - 2003 et la procédure BPP a été optimisée dans le cadre d'un nouveau projet européen EMG (Inter-laboratory testing for Enhancement of Microbial Growth) en 2005 - 2006.

Le test BPP est réalisé en laboratoire en incubant dans l'obscurité à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ des échantillons de matériau, d'une surface totale d'environ 100 cm^2 , dans une eau du robinet biologiquement stable (600 ml), à laquelle sont ajoutés des sels de potassium et des micro-organismes d'eau de rivière. Les concentrations de biomasse active formée sur le matériau (biofilm) et dans l'eau (biomasse en suspension) sont mesurées sur une période de 16 semaines, après 8, 12 et 16 semaines d'exposition. La biomasse est détachée du matériau par un appareil à ultra-sons (40 KHz).

Dans le test BPP, on mesure la production de biomasse active en fonction du temps en présence du matériau testé. Le test BPP est une méthode statique sans remplacement de l'eau. Dans cette situation, la concentration de la biomasse active dépend de la quantité de composés biodégradables provenant du matériau et assimilables par les micro-organismes.

La production de biomasse (BPP, en picogrammes d'ATP par cm^2) est calculée à partir de la concentration de biomasse fixée (pouvoir de formation de biofilm ou BPF) et de la concentration de biomasse planctonique, en suspension dans l'eau (SBP) en utilisant le rapport Surface / Volume ; la valeur de BPP est la moyenne des valeurs obtenues aux semaines 8, 12 et 16. Ainsi, $\text{BPP} = \text{BFP} + \text{SBP} / 3$.

Des bactéries, telles que *Legionella* ou d'autres espèces bactériennes, peuvent être ajoutées à l'eau au démarrage du test. De cette manière, une information complémentaire est obtenue sur le degré de capacité d'un matériau particulier à favoriser la croissance de *Legionella* ou d'autres espèces bactériennes dans les conditions du test (Van der Kooij et Veenendaal, 2001).

L'analyse d'ATP est aussi utilisée pour déterminer la concentration de biofilm sur les parois des canalisations dans un appareil spécifique afin d'obtenir le taux de formation de biofilm (BFR) de l'eau potable (Van der Kooij *et al.* 2003).

La mesure de la flore bactérienne (Autriche)

La méthode normalisée autrichienne (Önorm B5018 : 2002) utilise des tuyaux remplis d'eau du robinet remplacée chaque semaine et incubés à $22 \pm 2^\circ \text{C}$. Une aération de l'eau est réalisée à une pression de 0,3 bar. Après un, deux et trois mois d'incubation, la flore bactérienne hétérotrophe (test HPC) de l'eau des tuyaux est dénombrée, puis à la fin du test, la croissance du biofilm sur la paroi interne est évaluée, après sonication, par le dosage de l'ATP. Les échantillons tests sont des anneaux de 1 cm de hauteur découpés, dans des conditions stériles, à 20 cm au-dessus de l'extrémité des tuyaux testés.

Le diamètre intérieur recommandé pour les échantillons tests est de 4 cm, ce qui donne un rapport Surface / Volume de 1 cm^{-1} . La longueur de l'échantillon du tuyau est de 100 cm. Les tuyaux sont fixés en position verticale et leurs extrémités sont fermés par des bouchons de polyéthylène. Leur extrémité supérieure est recouverte d'une boîte de Pétri stérile.

L'évaluation est effectuée par rapport à un témoin négatif (verre) et un témoin positif (matériau souple PVC-P). Les matériaux ne sont pas recommandés pour l'utilisation au contact de l'eau potable si le dénombrement de la flore bactérienne hétérotrophe de l'eau testée au contact du matériau est 10 fois plus élevé que le témoin négatif (verre) ou lorsque la concentration de biofilm sur l'échantillon de tuyau est 5 fois plus élevée que pour le verre.

Les résultats ne sont valables que si la valeur de la flore bactérienne hétérotrophe du témoin positif (matériau souple PVC-P) est au minimum 100 fois plus élevée que la valeur du témoin négatif (verre) et que la quantité de biofilm observée sur le matériau souple est au minimum 10 fois plus élevée que celle observée sur le verre.

La norme CEN/TC164 WG3 N 1019 (Europe)

Dans le cadre du projet de l'Union Européenne "Développement de tests harmonisés utilisés pour les matériaux au contact de l'eau potable" (CPDW), le groupe de travail 1 (WP1) "Croissance microbienne" a développé, en 2003 et 2006, une

méthode d'étude harmonisée pour évaluer les propriétés de promotion de la croissance microbienne des matériaux au contact de l'eau potable. Le projet de norme européenne du CEN/TC164/AHG3 "Influence sur l'eau des matériaux destinés à entrer en contact avec l'eau destinée à la consommation humaine - Développement de micro-organismes aquatiques" repose, en août 2009, sur l'ATP comme indicateur de biomasse.

La procédure est applicable pour tous types de matériaux avec une surface solide et qui ne relarguent pas de composés toxiques pour les micro-organismes. Ces matériaux comprennent les produits naturels et synthétiques, organiques et inorganiques (avec ou sans ajout de composés organiques).

Des échantillons représentatifs du matériau testé sont incubés à l'obscurité, à une température de $30 \pm 2^\circ \text{C}$, dans de l'eau potable, sans résidus de désinfectant, renfermant des nutriments inorganiques définis et inoculée par un mélange de

micro-organismes naturels provenant d'une eau de rivière. Les échantillons de matériaux sont incubés jusqu'à 16 semaines à un rapport constant de $0,16 \text{ cm}^{-1}$. Des anneaux de verre, soigneusement lavés, servent de témoin négatif. Le matériau souple PVC-P est utilisé comme témoin positif. L'eau du test est remplacée par de l'eau du robinet à une fréquence d'une fois par semaine.

La formation de biomasse sur la surface du matériau (biomasse fixée) et dans l'eau (biomasse en suspension) est déterminée par des mesures d'ATP après 8, 12 et 16 semaines d'incubation, en picogrammes d'ATP par centimètre-carré de surface. Les échantillons de matériaux sont recueillis à ces périodes et la biomasse fixée est détachée à l'aide d'ultra-sons. La concentration d'ATP est utilisée comme une mesure de la présence d'une biomasse microbienne active. La validation des résultats est obtenue en incluant dans le test des témoins négatifs (moins de 10 ng ATP/dm^2) et des témoins positifs (plus de 10 ng ATP/dm^2) en parallèle aux matériaux testés.

TABLEAU 2-2 : Caractéristiques des méthodes statiques de détermination du pouvoir de croissance microbienne des matériaux au contact de l'eau potable

Condition / paramètre	BS 6920-2.4 (UK)	DVGW W270 (D)	BPP (NL)	Önorm B 5018 (A)	CEN TC164 WG3 N1019
Température (°C)	30 ± 1	12 ± 5	25 ± 1	22 ± 2	30 ± 2
Surface (S) (cm ²) du matériau test	150	800	12 x 8	1256 - 3140	150
Volume (V) (cm ³) de l'eau	1000	> 100 000	600	1256 - 7850	900
S / V (cm ⁻¹)	0,15	-	0,16	1	0,16
Remplacement de l'eau	2 fois/semaine	continu	aucun	1 fois/semaine	1 fois/semaine
Type d'eau	eau potable	eau potable	eau potable + eau de rivière au début du test	eau potable	eau potable + eau de rivière au début du test
Durée du test (semaines)	8	12	16	12	16
Activité microbienne	oxygène	Volume du dépôt	ATP	HPC + ATP	ATP

TABLEAU 2-3 : Comparaison des méthodes BPP, MDOD et W270 selon les matériaux étudiés

Matériau	BPP (pg ATP/cm ²)	MDOD (mg O ₂ /l)	W270 R (Corrigé) (ml/800 cm ²)
Verre (témoin)	28	- 0,2	0,02 (< 0,01)
Acier inoxydable	80	- 0,2	< 0,01 (< 0,1)
PVC-U	90	- 0,3	< 0,01 (0,0)
PVC-C	115	0,1	0,01 (0,0)
Cuivre	310	0,0	0,09 (0,2)
Silicone- SiLR	390	- 0,1	0,01 (< 0,1)
Polypropylène- PP	400	0,0	0,02 (0,0)
PE 80	430	0,3	0,02 (< 0,1)
PE 100	675	0,2	< 0,01 (0,0)
PE 40	760	- 0,1	0,02 (0,0)
Caoutchouc EPDM b	7 570	0,4	0,12 (0,3)
Caoutchouc EPDM a	17 030	4,7	9,75 (14)
PVC-P	40 270	4,0	1,25 (3,3)
Caoutchouc SBR	48 205	5,0	3,5 (7,0)

Le pouvoir de production de biomasse (BPP) du matériau testé est la concentration moyenne des valeurs de production de biomasse observées sur la surface du matériau et dans l'eau, après 8, 12 et 16 semaines d'incubation, en retranchant la valeur moyenne observée sur le témoin négatif.

Les données recueillies par des expérimentations réalisées dans plusieurs pays européens ont démontré que le test BPP proposé dans le projet de norme européenne est une méthode d'intérêt pour déterminer les propriétés de promotion de la croissance microbienne des matériaux au contact de l'eau potable. Le test révèle des valeurs de BPP allant de moins de 50 pg ATP/cm² (verre, acier inoxydable, cuivre, C-PVC) jusqu'à plus de 40 000 pg ATP/cm² pour le matériau souple PVC-P. Toutefois, les valeurs acceptables pour l'utilisation des matériaux au contact de l'eau potable ne sont pas définies pour ce test.

La comparaison entre le test BPP proposé dans la norme (BPP révisé) et la méthode originale BPP (aucun remplacement de l'eau, flacons d'Erlenmeyer bouchés) a montré des similitudes et des différences. Les matériaux avec des valeurs BPP basses dans la méthode originale ont donné des valeurs plus élevées dans le test BPP révisé. Cet effet est probablement dû à l'introduction de

composés biodégradables par le remplacement de l'eau et la fonction de fermeture moins efficace du couvercle des récipients. Les valeurs BPP intermédiaires étaient similaires dans les deux tests, mais à des valeurs élevées, le protocole révisé a donné des valeurs beaucoup plus élevées que dans le test BPP original. Les différences peuvent être dues aux disparités entre les joints utilisés, par exemple de différents lots, et/ou à la présence de composés inhibiteurs de croissance dans le test sans remplacement de l'eau.

Le tableau 2-2 présente les principales caractéristiques des méthodes statiques d'évaluation du biofilm.

Comparaison des méthodes statiques

Un certain nombre de matériaux ont été testés avec les trois méthodes proposées : BPP, MDOD et W270. L'objectif principal était d'obtenir des informations pour l'élaboration de critères acceptables selon les résultats observés avec le test BPP. Aucune indication pour une relation avec la méthode autrichienne ne peut être donnée.

Les résultats de cette étude comparative sont présentés sur le tableau 2-3.

Les résultats de cette étude comparative montrent que les valeurs du test BPP ont une large distribution : elles vont de 28 pg ATP/cm² (verre) jusqu'à 48 000 pg ATP/cm² (caoutchouc). Des valeurs négatives sont observées pour la méthode MDOD et pour 11 des 14 matériaux testés, les valeurs MDOD sont au-dessous du seuil de détection de 0,6 mg O₂/l. Pour le test W270, 9 des 14 matériaux étudiés sont au-dessous du seuil de détection de 0,01 ml/800 cm². Le volume du dépôt peut comprendre des constituants ne faisant pas partie de la biomasse (par exemple, des produits de corrosion du cuivre).

Selon les comparaisons entre ces trois méthodes, il a été estimé que :

- le critère acceptable du test MDOD (2,4 mg O₂/l) correspondrait à une valeur BPP d'environ 20 000 pg ATP/cm².
- le seuil de détection du test MDOD (0,6 mg O₂/l) correspondrait à une valeur BPP d'environ 5 000 pg ATP/cm².
- le critère acceptable du test W270 (0,1 ml/800 cm²) correspondrait à une valeur BPP d'environ 2 000 pg ATP/cm².

Afin de définir des critères acceptables fondés sur les résultats du test BPP, des études ont été menées aux Pays-Bas par le centre technique du Kiwa. Les valeurs obtenues par le test BPP ont été comparées aux concentrations de biofilm mesurées dans les systèmes de distribution d'eau (matériaux en PVP-U, diamètre 110 mm) et aux concentrations d'ATP mesurées dans l'eau des systèmes de distribution d'eau (241 sites).

Des classes de qualité ont été ainsi proposées pour le test BPP (tableau 2-4)

Le test BPP a été optimisé et standardisé avec la collaboration de chercheurs européens. Il se révèle plus sensible que les tests MDOD et W270, ce qui permet une différenciation entre les matériaux à des niveaux bas de promotion de la croissance microbienne. La définition de critères acceptables a conduit à établir des classes de qualité selon le test BPP.

TABLEAU 2-4 : Classes de qualité des matériaux selon le test BPP

Classe de qualité I		Classe de qualité II		Classe de qualité III		Classe de qualité IV	
A	B	A	B	A	B	A	B
verre							
acier inoxydable		PE-Xc				EPDM	
PVC C		PE				PVC P	
PVC U		PE				caoutchouc	
10	10 ²	↑	10 ³	↑	↑	10 ⁴	↑ 10 ⁵
BPP (pg ATP/cm²)							

↑ test W270 : seuil de détection et critère acceptable
 ↑ test MDOD : seuil de détection et critère acceptable

➤ Le nouveau document de travail de septembre 2010 de la norme européenne du CEN/TC164/WG3 "Influence des matériaux sur l'eau destinée à la consommation humaine - Promotion de la croissance microbienne" décrit trois méthodes qui peuvent être appliquées pour déterminer l'aptitude des matériaux non métalliques à promouvoir la croissance microbienne dans l'eau destinée à la consommation humaine :

- **méthode 1** : elle utilise les modifications des concentrations d'ATP comme une mesure de l'activité microbienne. Cette méthode, développée par les Pays-Bas, a été dans un premier temps, promue dans le projet CPDW de 2003 et 2006.
- **méthode 2** : elle utilise une mesure volumétrique de la formation de biofilm. Cette méthode allemande a été publiée dès 1984 comme norme DVGW W270. Elle est utilisée pour la certification des matériaux avec des valeurs limites établies depuis plusieurs années.
- **méthode 3** : elle utilise la consommation de l'oxygène dissous dans l'eau comme une mesure de l'activité microbienne (MDOD). Cette norme anglaise, d'abord publiée comme BS DD82 en 1982 est maintenant publiée en BS 6920 Section 2-4 (1989 et 2000) et est utilisée pour l'approbation de matériaux avec des valeurs limites.

Chacune de ces méthodes utilise des caractéristiques de performance différentes qui permettent leur utilisation pour des matériaux spécifiques ou types de produits, mais ont aussi leurs limites. Par exemple, les matériaux assemblés, comme les multi-couches, ne peuvent être testés avec la méthode 1 (ATP) et la méthode 3 (MDOD), et les graisses ou lubrifiants ne peuvent être testés avec la méthode ATP et la méthode 2 (W270). Des normes spécifiques aux produits devront définir les méthodes non applicables pour certains matériaux ou produits, en indiquant les raisons de cette non applicabilité.

Les trois méthodes utilisent des mélanges naturels de micro-organismes aquatiques pour évaluer la promotion de la croissance pour chaque échantillon de matériau. La flore naturelle comprend plusieurs souches qui sont adaptées pour vivre dans un environnement relativement hostile comme l'eau potable et les résultats des tests utilisant des flores naturelles ont montré une bonne corrélation

avec la croissance sur des matériaux en pratique. Les nombres, types et exigences de croissance de micro-organismes indésirables, présents dans l'eau potable, varient considérablement et aucune technique de culture n'existe pour dénombrer tous les micro-organismes aquatiques qui peuvent être présents dans un échantillon d'eau. Ainsi, les nombres globaux de micro-organismes sont généralement évalués en utilisant des mesures indirectes de leur activité.

La technique d'évaluation de l'activité microbienne est différente pour chacune des méthodes décrites dans le projet de norme européenne. Dans la méthode 1 (ATP), la croissance microbienne de surface et planctonique est déterminée en utilisant l'ATP comme une méthode de détermination de la biomasse active. Dans la méthode 2 (W270), la somme des biomasses actives et non actives est déterminée par volumétrie sur la surface du matériel testé. Elle détecte les micro-organismes vivants et morts, ainsi que les substances polymériques extracellulaires. Dans la méthode 3 (MDOD), la mesure de la consommation de l'oxygène dissous est utilisée comme une mesure de la croissance du biofilm et des micro-organismes planctoniques : la plupart des organismes qui peuvent atteindre une croissance significative ont une respiration aérobie et exercent une influence sur la concentration d'oxygène dissous dans l'eau dans le test.

Une variété de facteurs peut influencer l'aptitude des organismes vivants à répondre de manière prévisible ; ainsi, des procédures de validation sont une partie essentielle de tout essai biologique. Pour les trois méthodes décrites, la validation est obtenue par l'utilisation de matériaux et de systèmes de référence.

Il est important de noter qu'aucune de ces trois méthodes ne permet de faire des conclusions sur le comportement physique, chimique ou toxicologique des matériaux, ni sur leur résistance aux détergents ou désinfectants. En outre, aucune de ces méthodes fournit des informations sur la pathogénicité des micro-organismes dont les nombres peuvent être augmentés par des nutriments relargués par le matériau testé.

La définition de critères acceptables ne fait pas partie de cette norme mais reste un sujet pour les législateurs nationaux.

2.3 Comparaison des matériaux selon les méthodes statiques

De nombreux travaux ont été réalisés ces dernières années pour évaluer les propriétés de promotion de la croissance microbienne de plusieurs matériaux au contact de l'eau potable.

Les méthodes développées par le Kiwa aux Pays-Bas (Veenendaal et Van der Kooij, 1999 ; Van der Kooij, 2001) ont permis d'appréhender les différences d'aptitude des matériaux à promouvoir la croissance microbienne.

Première étude du Kiwa

Les matériaux choisis pour le test BFP (Pouvoir de formation du biofilm) sont présentés dans le tableau 2-5.

Les résultats montrent une différence notable entre les matériaux testés (figure 2-2).

Une formation relativement forte de biofilm est observée avec les deux échantillons de cuivre testés (350 et 590 pg ATP/cm²). La présence d'huile minérale et l'effet de la corrosion peuvent en être la cause. Après une exposition à long terme (208 jours), la concentration de biomasse fixée diminue jusqu'à une faible valeur, inférieure à 100 pg ATP/cm².

Pour les matériaux synthétiques, les deux échantillons testés de C-PVC et un échantillon de polybutène (PB) donnent les plus faibles valeurs de BFP, respectivement de 140, 270 et 220 pg ATP/cm². Toutefois, la concentration de biofilm après 233 jours d'incubation chute à un niveau inférieur à 100 pg ATP/cm² uniquement pour le C-PVC. Les matériaux à base de polyéthylène donnent la formation de biofilm la plus forte, à plus de 1 000 pg ATP/cm².

La concentration de biomasse dans l'eau du test montre la même distribution que la concentration de biofilm sur le matériau, mais la majorité de la biomasse est localisée sur les matériaux.

TABLEAU 2-5 : Matériaux choisis pour le test BFP (Pouvoir de formation du biofilm)

Matériau	Sigle
Polyéthylène Xa	PE-Xa
Polyéthylène Xc	PE-Xc (x 2)
Polyéthylène renforcé par une feuille interne d'aluminium	Al / PE-MD
Polypropylène-R	PP-R (x 2)
Polybutène	PB (x 2)
Polychlorure de vinyle sur chloré	C-PVC (x 2)
Cuivre irradié	Koper (1)
Cuivre désoxydé	Koper (2)
Acier inoxydable AISI 316	RVS

En présence de la plupart des matériaux, il apparaît au début une croissance forte de *Legionella* dans l'eau du test, mais le nombre de colonies décroît au cours du temps. Cette chute est moins prononcée sur les matériaux.

Des valeurs supérieures à 1 000 UFC/ml sont observées dans l'eau du test pour quelques matériaux, principalement les polyéthylènes (PE-Xa, PE-Xc et Al / PE-MD). Par contre, avec les deux échantillons de C-PVC, la croissance des *Legionella* dans l'eau est faible (10 UFC/ml) et inférieure à celle relevée en présence de cuivre (160 et 220 UFC/ml).

Après 112 jours, le nombre de colonies dans l'eau en présence de la plupart des matériaux diminue jusqu'à des valeurs autour de 100 UFC/ml, sauf en présence du polyéthylène PE-Xa et du polyéthylène renforcé par une feuille interne d'aluminium pour lesquels le nombre de colonies est autour de 1 000 UFC/ml.

Deuxième étude du Kiwa

Cinq matériaux en PVC et dix matériaux en polyéthylène PE (5 types de PE-40, et 5 types de PE-80) ont été étudiés selon le test BPP. Les valeurs moyennes de BPP sont calculées sur la base des mesures des concentrations de biomasse sur les matériaux (pouvoir de formation du biofilm, BFP) et dans l'eau (biomasse en suspension, SBP), après des périodes de 8, 12 et 16 semaines d'incubation (figure 2-3).

La partie inférieure des barres correspond à la biomasse présente sur le matériau (BFP). La partie supérieure correspond à la fraction présente dans l'eau (SBP). L'écart type des valeurs BPP est aussi présenté.

Le pouvoir de production de biomasse (BPP) du PVC-U est faible (50 - 100 pg ATP/cm²). Celui des matériaux en polyéthylène est 10 à 30 fois plus élevé. Le pouvoir de production de biomasse pour le PE-40 est en général plus élevé que celui du PE-80. La majeure partie de la biomasse des matériaux en polyéthylène est présente en tant que biofilm sur le matériau.

Une croissance relativement forte de micro-organismes apparaît après quelques semaines, suivie d'une diminution du contenu en ATP. Ce développement indique que des substances biodégradables sont présentes sur la surface du matériau et entraînent une rapide croissance des micro-organismes. Lorsque ces substances

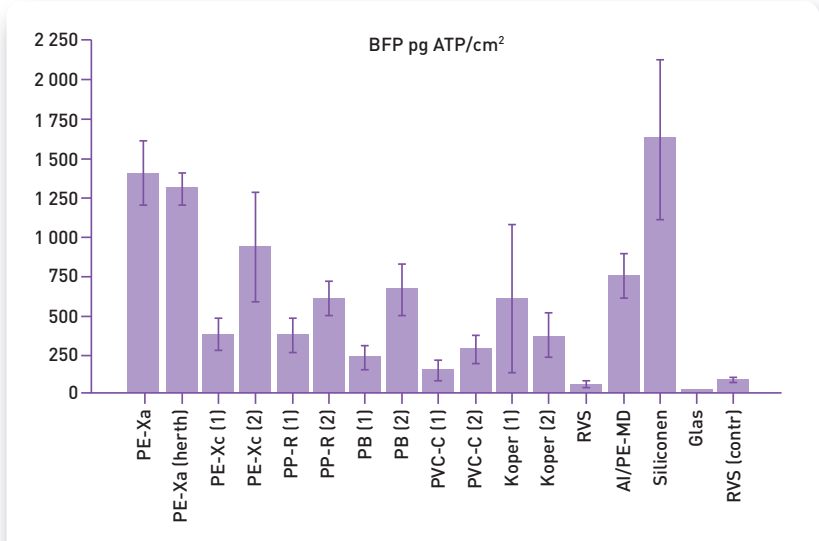
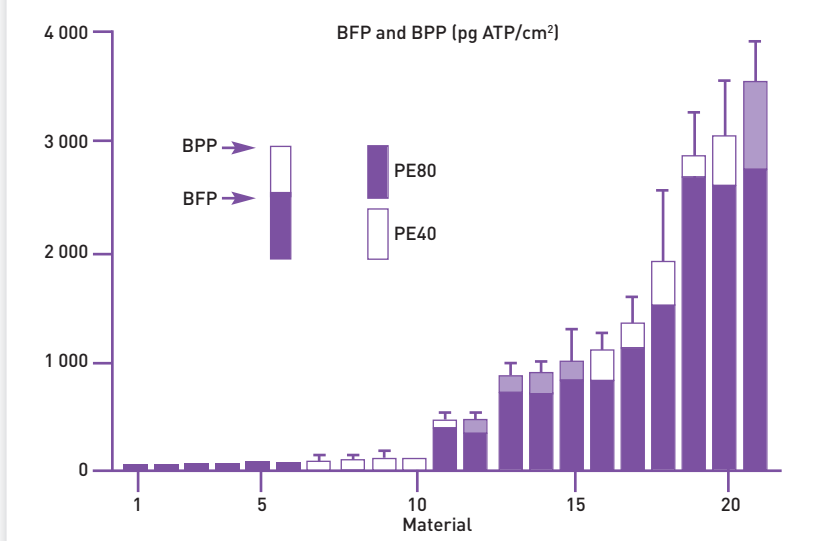


Figure 2-2 : pouvoir de formation du biofilm (BFP) des matériaux en pg ATP/cm²



N°1 et 2 : verre ; N° 3 et 4 : acier inoxydable ; N° 5-10 : PVC-U ; N° 11 : polypropylène ; N° 12-15 : PE-80 ; N° 16-20 : PE-40 ; N° 21 : PE-80

Figure 2-3 : pouvoir de production de biomasse (BPP = BFP + SBP) des matériaux en PVC et en polyéthylène

ont, pour la plus grande part, été utilisées par les micro-organismes, l'activité diminue et un équilibre s'instaure entre l'apport de substances biodégradables et l'activité des micro-organismes sur les matériaux.

Troisième étude du Kiwa

Dix matériaux utilisés dans les systèmes de distribution d'eau ont été choisis pour être évalués par le test BPP. Sur le plan cinétique (figure 2-4), la concentration de biofilm sur les matériaux augmente rapidement et atteint sa valeur maximale en 1 à 2 semaines. Mais si pour la plupart des matériaux testés, la production de biomasse se stabilise, pour l'échantillon de cuivre testé, les concentrations de biofilm augmentent progressivement.

La répartition des valeurs de production de biomasse des matériaux testés est présentée sur la figure 2-5.

La production de biomasse peut atteindre 1 800 pg ATP/cm². Pour la plupart des matériaux, la grande majorité (> 80 %) de la biomasse produite est présente sur le matériau. Dans cette étude, les valeurs BPP de plusieurs matériaux synthétiques (C-PVC, polybutène, polypropylène et polyéthylène Xc) sont plus faibles que celles du cuivre.

Le pouvoir de croissance des *Legionella* (Leg GP UFC/cm²) sur les matériaux par le test BPP est présenté sur la figure 2-6. Des valeurs jusqu'à 20 000 UFC/cm² ont été retrouvées pour certains matériaux en polyéthylène.

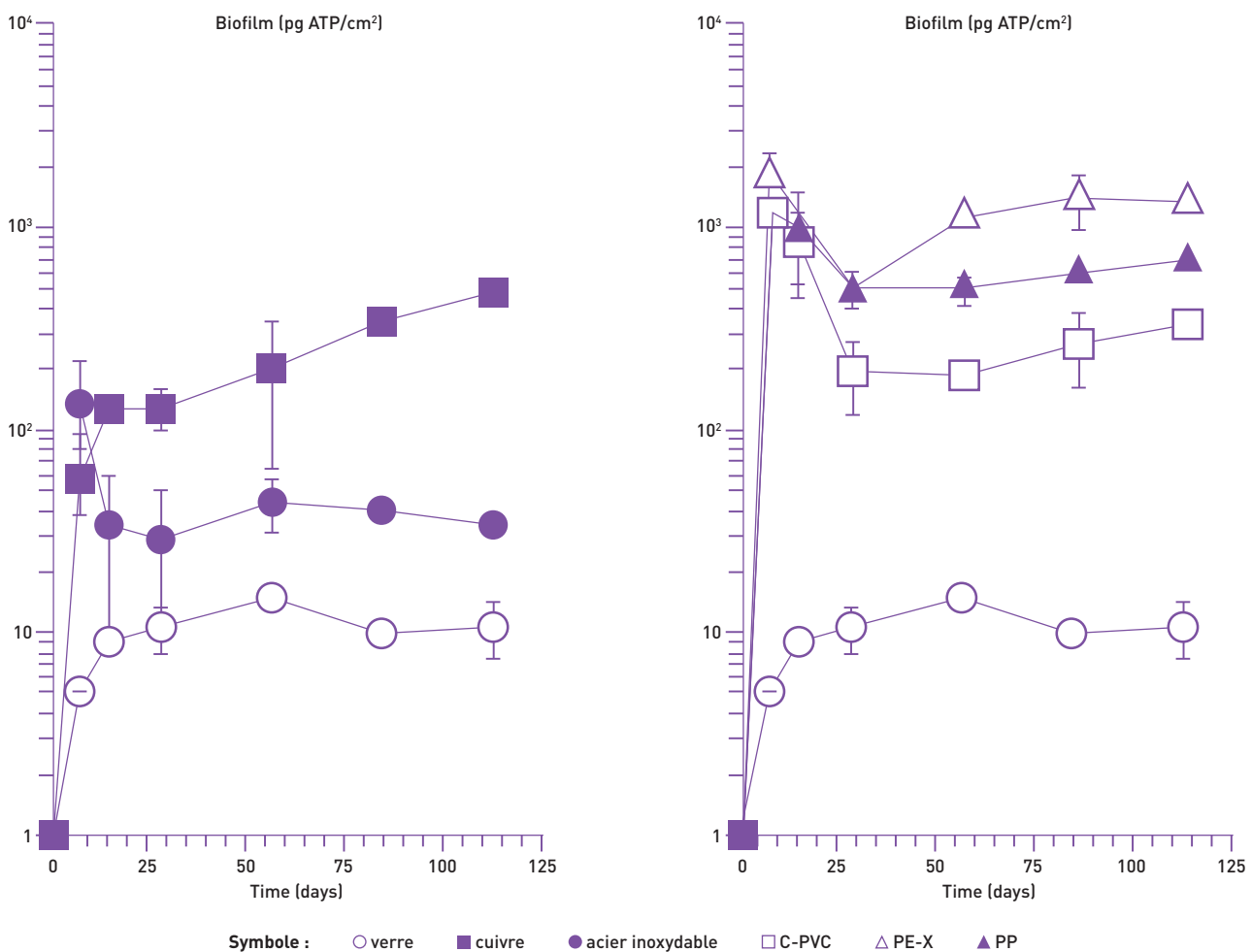


Figure 2-4 : formation de biofilm sur les matériaux durant l'incubation dans une eau biologiquement stable (filtration lente sur sable) à 25°C

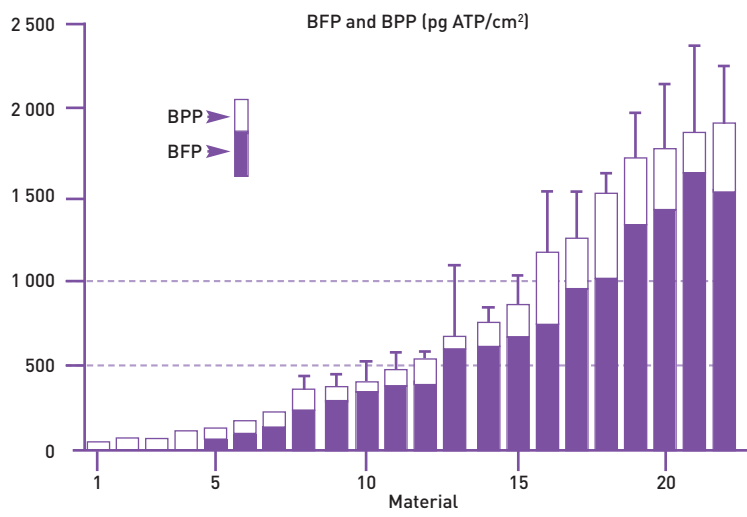
Les résultats des études menées par le Kiwa aux Pays-Bas montrent clairement que le pouvoir de formation de biomasse des matériaux, mesuré par le test BFP ou le test BPP, diffère significativement d'un matériau à l'autre.

La quantité de biomasse formée sur la surface du matériau au contact de l'eau potable dépend du relargage par le matériau de composés biodégradables et de la mort des micro-organismes (y compris la phagocytose par des protozoaires prédateurs). La croissance microbienne peut apparaître aussi du fait de la détérioration du matériau.

Certains des matériaux testés ont des scores équivalents ou meilleurs que le cuivre. Les canalisations en cuivre présentent une formation de biofilm relativement forte et les concentrations augmentent de manière linéaire en fonction du temps. La formation de biofilm est probablement le résultat de la présence d'huile minérale sur les tuyaux de cuivre. Si la corrosion joue aussi un rôle par l'apport de composés organiques, la composition de l'eau (pH, carbone organique et inorganique) peut avoir un impact sur la promotion de la croissance microbienne sur le cuivre.

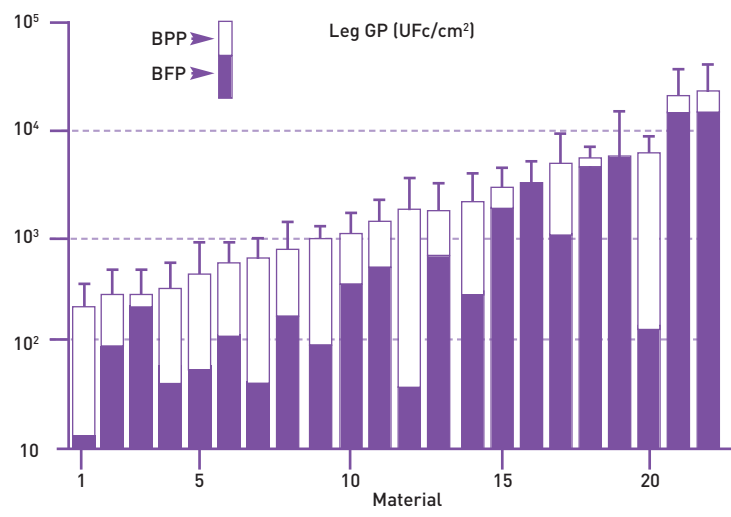
Ces observations montrent que les scores du cuivre sont bien moindres que ce qui était attendu pour un matériau qui ne relargue aucun composé favorisant la croissance microbienne et qui serait même inhibiteur de croissance. Les souches de *Pseudomonas* et d'*Aeromonas* sont relativement sensibles au cuivre mais de faibles concentrations de cuivre ont peu d'effet sur *Legionella* et des souches de *Mycobacterium*.

La classification en classes de qualité ne permet pas d'indiquer les domaines d'application des matériaux. Dans la définition des domaines d'application, des facteurs tels que la longueur de la canalisation, le diamètre (rapport surface/volume) et la température de l'eau jouent un rôle important.



Matériaux : N° 1, 2 et 3 : verre • N° 4, 5 et 6 : acier inoxydable • N° 7 : C-PVC • N° 8 : PB • N° 9 : C-PVC • N° 10 : cuivre • N° 11 : PP-R • N° 12 : PE-Xc • N° 13 : cuivre • N° 14 : PP-R • N° 15 : PB • N° 16 : PE-Xc • N° 17 : Sil. • N° 18 : PE-Xa • N° 19 : PE-Xa • N° 20 : Sil. • N° 21 : Al/PE-Xb ; N° : Sil.

Figure 2-5 : pouvoir de production de biomasse (BPP = BFP + SBP) des matériaux choisis et des matériaux de référence



Matériaux : N° 1 et 2 : verre • N° 3 : C-PVC • N° 4 : acier inoxydable • N° 5 : verre • N° 6 : PE-Xa • N° 7 : silicone • N° 8 : acier inoxydable • N° 9 : cuivre a • N° 10 : acier inoxydable • N° 11 : PE-Xc • N° 12 : silicone • N° 13 : cuivre b • N° 14 : PP-R • N° 15 : PB • N° 16 : C-PVC • N° 17 : PE-Xc • N° 18 : PB • N° 19 : PP-R • N° 20 : silicone • N° 21 : PE-Xa ; N° 22 : Al/PE-Xb

Figure 2-6 : Pouvoir de croissance des Legionella des matériaux choisis après incubation à 25° C dans le test BPP

Etude du CRECEP - LHVP

La méthode d'essai choisie est le test BPP (Pouvoir de Production d'une Biomasse) qui a été développé au niveau européen dans le cadre d'une réglementation future EAS (European Acceptance Scheme). Cette réglementation devait aboutir à la mise en place d'un marquage unique pour tous les matériaux en contact avec l'eau destinée à la consommation humaine et au libre échange de ces produits en Europe.

L'étude avait pour objectif principal d'évaluer l'aptitude de six matériaux à promouvoir la croissance microbienne (Enkiri *et al.* 2006). Ces matériaux sont couramment employés pour les canalisations des installations intérieures de distribution d'eau : cuivre, C-PVC, acier inoxydable, polybutène et polypropylène.

Les conditions du test sont les suivantes :

- prétraitement des éprouvettes de 50 cm² : rinçage (1 h), immersion (24 h à 23° C) et rinçage (1 h) avec l'eau de distribution, prélavage avec l'eau du test durant 2 mm ;
- mise en eau des éprouvettes (2 flacons par matériau) : eau du robinet supplémentée au phosphore (2 mg/L) et stable biologiquement (Carbone organique total : 0,9 ± 0,4 mg/L ; ATP ≤ 10 ng/L), inoculé avec 1 % d'eau de Seine (mélange de micro-organismes autochtones afin d'accélérer la formation du biofilm et d'obtenir une diversité microbienne), filtrée sur membrane 1,2 µm, avec trois éprouvettes par 900 ml d'eau (rapport surface/volume = 0,15 à 0,17 cm⁻¹) ;
- eau de trempage renouvelée chaque semaine afin d'éliminer les composés toxiques potentiels, d'assurer l'apport suffisant de composés inorganiques et d'être plus proche des conditions d'utilisation des matériaux (conditions semi-dynamiques) ;
- incubation des flacons à 30° C et à 50° C, à l'abri de la lumière ;
- évaluation des biomasses à 8, 12 et 16 semaines d'incubation :
 - dans l'eau : prélèvement de 300 ml pour mesure d'ATP
 - sur le matériau : libération du biofilm formé par action des ultrasons (2 mn à une fréquence 47 kHz, puissance maximale 335 W) pour mesure d'ATP dans le sonicat

- dosage d'ATP, après perméabilisation des parois microbiennes (extractant), à l'aide d'un système enzymatique "luciférine - luciférase" couplé à une détection par bioluminescence. En présence d'ions magnésium, d'oxygène et d'ATP, la luciférine est oxydée, la luciférase servant de catalyseur. La réaction est endergonique : elle consomme des molécules d'ATP en produisant des photons. L'émission de lumière est proportionnelle à la quantité d'ATP (RLU : Unité Relative de Lumière).

- validation des résultats du test par des matériaux de référence positif (PVC-P) et négatif (verre borosilicaté).

- calculs :

Biomasse fixée au temps t :

$B_{Ft} = [ATP] \text{ (pg/ml)} \times \text{volume du sonicat (ml)} / \text{surface de l'éprouvette (cm}^2\text{)}$

Biomasse libre au temps t :

$B_{Lt} = [ATP] \text{ (pg/ml)} \times \text{volume de l'eau prélevée (ml)} / \text{surface de l'éprouvette (cm}^2\text{)}$

Biomasse totale au temps t

(essais en duplicate) : $B_{Pt} = B_{Ft} + B_{Lt}$

BPP d'un échantillon ou d'un témoin :

$BPP = [(B_{Pt} + B_{Lt})_{t8}] + [(B_{Pt} + B_{Lt})_{t12}] + [(B_{Pt} + B_{Lt})_{t16}] / 3$ (moyenne des valeurs de BP obtenues aux temps 8, 12 et 16 semaines d'incubation)

BPP matériau = BPP échantillon - BPP négatif (verre borosilicaté)

L'eau de trempage, provenant de captages de sources acheminées par l'Aqueduc de la Vanne ou du Loing, était conforme du point de vue physico-chimique aux recommandations du test. Elle a présenté une stabilité physico-chimique et biologique tout au long de l'étude.

Le témoin positif PVC-P montre des valeurs de biomasse totale supérieure aux 10 000 pg ATP/cm² exigés, ce qui révèle l'absence de composés inhibiteurs de croissance microbienne dans l'eau de trempage durant les 4 mois d'incubation aussi bien à 30° C qu'à 50° C. Le témoin négatif, verre borosilicaté, montre des valeurs de BPP de 133 pg ATP/cm² à 30° C et de 115 pg ATP/cm² à 50° C.

A une incubation de 30° C, les six matériaux testés semblent peu ou modérément aptes à engendrer la formation de biomasses ; seuls l'acier inoxydable 304 (477 pg ATP/cm²) et le polypropylène (495 pg ATP/cm²) donnent des valeurs de BPP proches de 500 pg ATP/cm². Les deux variétés d'acier inoxydable ne se comportent pas de la même manière, l'acier inoxydable 304

TABLEAU 2-6 : Valeurs moyennes de BPP pour six matériaux incubés à 30° C et 50° C

Matériau	BPP (pg ATP/cm ²) 30°C	BPP (pg ATP/cm ²) 50°C
Verre borosilicaté	0	0
Cuivre	30	37
C-PVC	13	32
Inox 304	477	14
Inox 316	0	114
Polybutène	32	101
Polypropylène	495	1 263

apparaissant plus promoteur. Ceci pourrait s'expliquer par sa structure dépolie donnant une meilleure surface d'accroche aux micro-organismes.

A une incubation de 50° C, les six matériaux testés semblent peu ou moyennement aptes à engendrer la formation de biomasses ; seul le polypropylène donne une valeur de BPP proche de 1 200 pg ATP/cm². Les deux variétés d'acier inoxydable n'ont pas le même comportement, mais à 50° C, c'est l'acier inoxydable 316 qui apparaît le plus apte à favoriser la formation de biomasses. Il est à noter l'accroissement des biomasses formées au contact du cuivre au cours du temps : passage de 71 pg ATP/cm² à 259 pg ATP/cm². Ce phénomène pourrait traduire une adaptation des micro-organismes présents ou bien encore une diffusion limitée dans le biofilm des molécules bactériostatiques et/ou bactéricides libérées par le cuivre.

Les résultats observés à 30° C comme à 50° C (tableau 2-6 et figures 2-7, 2-8 et 2-9) montrent que l'aptitude d'un matériau à contribuer au développement microbien varie en fonction de sa nature. Le cuivre et le C-PVC apparaissent très peu promoteurs alors que le polypropylène induit la plus importante concentration en biomasse, celle-ci restant toutefois limitée (< 1 300 pg ATP/cm²).

La température a un impact sur la production de biomasse, les valeurs de BPP des six matériaux

testés étant différentes selon la température d'incubation. Une élévation de température peut agir à la fois sur le matériau (biodégradabilité accélérée, libération accrue de substances assimilables) et sur les propriétés du biofilm, par la sélection d'espèces microbiennes différentes ou le changement de l'état physiologique des micro-organismes.

L'élévation de température produit, en général, un effet stimulant sur la croissance microbienne ; il en est ainsi du polypropylène, du polybutène et de l'acier inoxydable 316. Elle peut parfois induire une moins grande formation de biomasse, comme pour l'acier inoxydable 304. En ce qui concerne le cuivre et le C-PVC, les différences sont trop faibles pour être significatives et sont plutôt dues à la reproductibilité moyenne du test pour les faibles teneurs en ATP (seuil de sensibilité du luminomètre, différences dans l'extraction de l'ATP ou bien encore dans le décrochage des biomasses fixées).

Une recherche partielle des micro-organismes par dénombrement de la flore aérobie revivifiable et par identification et quantification de certains micro-organismes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Legionella*, amibes libres, ...) sur milieu sélectif ou par *Polymerase Chain Reaction* n'a pas permis de déterminer s'il y avait des différences dans les populations microbiennes aux deux températures d'incubation.

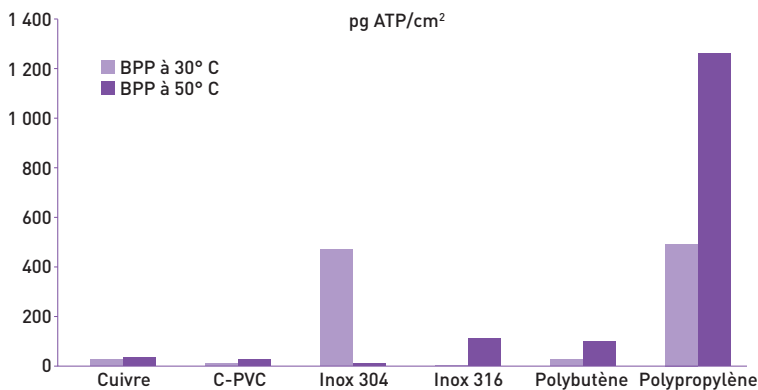


Figure 2-7 : comparaison des valeurs de BPP de six matériaux (moyennes des mesures après 8, 12 et 16 semaines d'incubation à 30° C et 50° C)

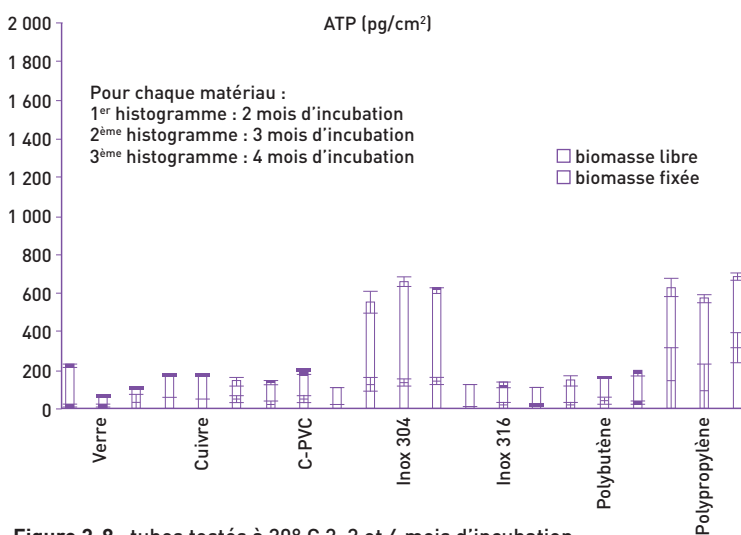


Figure 2-8 : tubes testés à 30° C 2, 3 et 4 mois d'incubation

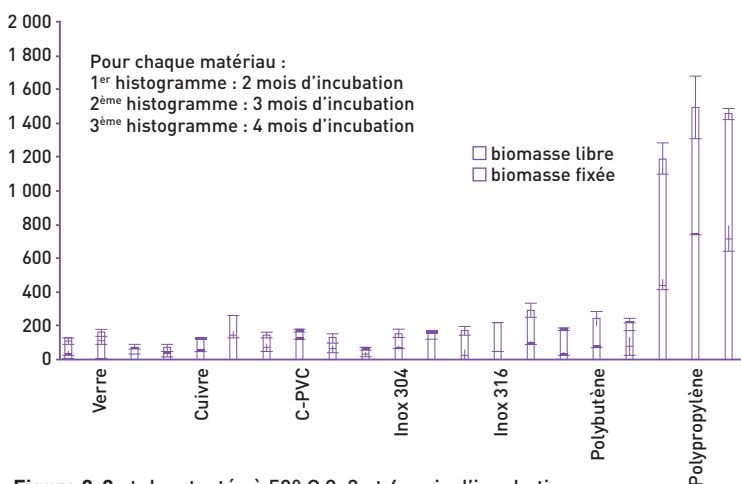


Figure 2-9 : tubes testés à 50° C 2, 3 et 4 mois d'incubation

Etude LHVP - Clermont Université

Les études statiques sont majoritairement réalisées sur des matériaux neufs. L'influence des paramètres liés aux traitements de nettoyage et/ou de désinfection et au vieillissement des réseaux (tartre, corrosion) n'est pas prise en compte.

L'étude a comme objectif principal d'évaluer l'influence des "traitements répétés" des matériaux sur leur potentiel à contribuer au développement microbien à l'aide de la méthodologie BPP. Les trois matériaux choisis, le cuivre, le C-PVC et une variété de Polyéthylène réticulé (PEX), sont couramment employés dans les installations intérieures de distribution d'eau.

Les trois matériaux sont conditionnés sous forme de tubes et découpés de façon à obtenir une surface de contact de 50 cm². Ils sont étudiés à l'état *neuf* et à l'état *traité*, obtenu après un traitement répété 120 fois et comprenant des procédures successives de nettoyage et de désinfection, classiquement utilisées pour les réseaux intérieurs de distribution (produits, durées et concentrations) et représentatives d'une durée de vie d'une installation à problèmes de contamination.

Le protocole suivant est réalisé au moyen d'un banc d'essai automatique (figure 2-10) :

- 3 heures dans un bain d'eau à 55° C agité et additionné d'hypochlorite de sodium en concentration 3 mg/L ;
- 1 heure dans un bain d'eau à 70° C agité simulant un traitement par choc thermique ;
- 0,5 h dans un bain d'acide phosphorique dilué à 15 %, à température ambiante et en statique ;
- 0,25 h de rinçage sous l'eau courante ;
- 1 heure dans un bain de peroxyde d'hydrogène de concentration 1 000 mg/L à température ambiante ;
- 0,25 h de rinçage sous l'eau courante.

Le prélèvement des échantillons se fait tous les 12 cycles au moment des changements des bains.

Un suivi des masses et de la tension de surface (Kruss K12) a été réalisé à chaque prélèvement d'échantillon. Des observations au microscope électronique à balayage (MEB JEOL SM 820) ont permis de caractériser la dégradation physique de la surface (figure 2-11).

Le C-PVC présente une prise de masse suivant une loi logarithmique. Au bout de 120 cycles de traitement, on observe une augmentation de la masse de 0,43 %. Ceci est attribué à la migration lente de l'eau à l'intérieur du matériau. La tension

de surface évolue peu dans le temps. Les observations MEB montrent une attaque très superficielle (craquelures et très petites piqûres).

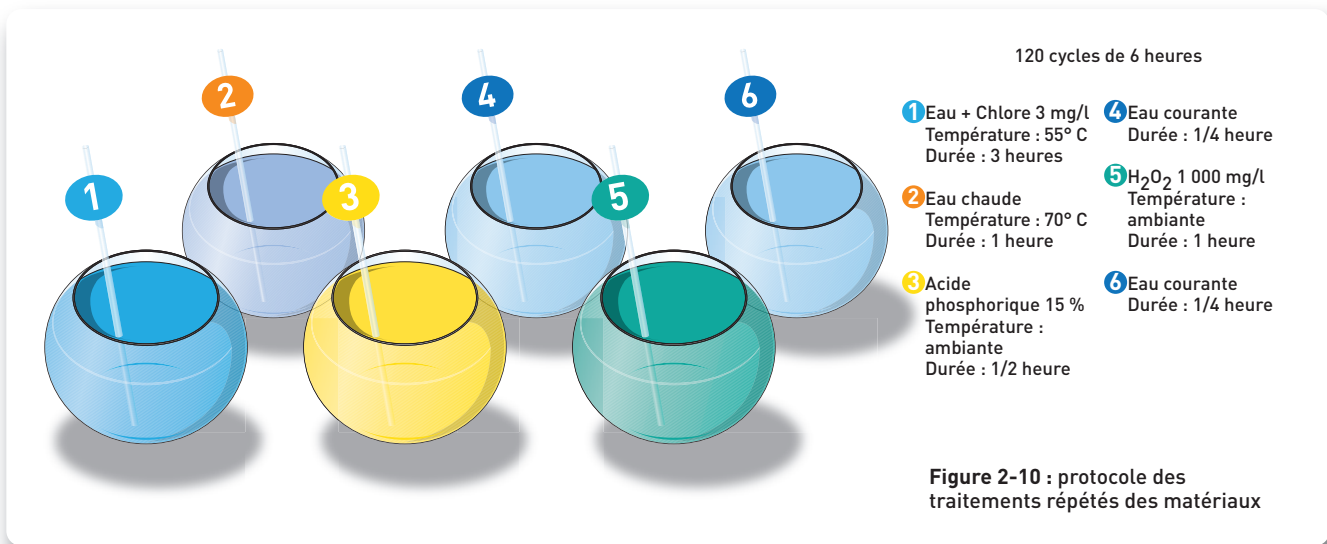
Le PEX, matériau non polaire, naturellement hydrophobe, présente une perte en masse, linéaire, qui atteint 0,089 % au bout des 120 cycles. Ceci est probablement lié à une attaque chimique en surface ou à une petite extraction de stabilisants. Les mesures de tension de surface montrent que la composante dispersive (Owens), correspondant à l'énergie de cohésion entre les molécules, reste constante, alors que la composante polaire augmente et traduit une attaque chimique de la surface. Les observations MEB confirment une érosion sélective avec perte de matière et phénomènes d'écaillage.

Le cuivre présente une perte de masse linéaire en fonction du nombre de cycles. La perte en masse est de 1,5 % au bout de 120 cycles. Les observations MEB montrent que les stries dues aux filières de mise en forme du cuivre sont plus marquées après les traitements thermiques et chimiques. Les joints de grains sont attaqués : le cuivre subit donc une corrosion généralisée et localisée aux joints de grains expliquant bien la perte de masse linéaire en fonction du nombre de cycles.

Les conditions du test BPP sont les suivantes :

- prétraitement des éprouvettes de 50 cm² : rinçage (1 h), immersion (24 h ± 1 h à température ambiante) et rinçage (1 h) avec l'eau du robinet, pré-lavage avec l'eau du test durant 2 mm ;

- mise en eau des éprouvettes (2 flacons par matériau) : eau du robinet (nappe d'Albien 90 % - usine d'Ivry 10 %) supplémentée en phosphates (2 mg/l) et stable biologiquement (Carbone organique total < 0,5 mg/l ; ATP ≤ 10 ng/l), inoculé avec 1 % d'eau de Seine (mélange de micro-organismes autochtones afin d'accélérer la formation du biofilm et d'obtenir une diversité microbienne), filtrée sur membrane 1,2 µm, avec trois éprouvettes par 900 ml d'eau (rapport surface/volume = 0,15 à 0,17 cm⁻¹) ;
- eau de trempage renouvelée chaque semaine afin d'éliminer les composés toxiques potentiels, d'assurer l'apport suffisant de composés inorganiques et d'être plus proche des conditions d'utilisation des matériaux (conditions semi-dynamiques) ;
- incubation des flacons à 30 ± 3° C, à l'abri de la lumière ;
- évaluation des biomasses à 8, 12 et 16 semaines d'incubation :
 - dans l'eau : prélèvement de 300 ml pour mesure d'ATP
 - sur le matériau : libération du biofilm formé par action des ultrasons à faible énergie (2 mn à une fréquence 42 kHz, puissance maximale 130 W) pour mesure d'ATP dans le sonicat.
- dosage d'ATP, après perméabilisation des parois microbiennes (extractant), à l'aide d'un système enzymatique "luciférine - luciférase" (Celsis Microbial Reagent Kit n° 93321) couplé à une détection par bioluminescence. En présence



d'ions magnésium, d'oxygène et d'ATP, la luciférase est oxydée, la luciférase servant de catalyseur. La réaction est endergonique : elle consomme des molécules d'ATP en produisant des photons. L'émission de lumière est proportionnelle à la quantité d'ATP (RLU : Unité Relative de Lumière).

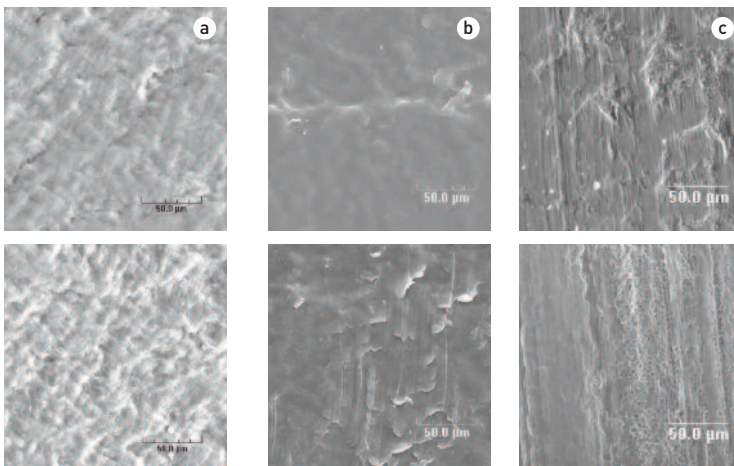
- validation des résultats du test par des matériaux de référence positif (PVC-P : $\geq 10\,000$ pg/cm²) et négatif (verre borosilicaté ≤ 100 pg/cm²).

L'aptitude d'un matériau à promouvoir la formation de biomasses est évaluée par le calcul de la valeur de BPP qui correspond à la moyenne des sommes de la biomasse libre et de la biomasse fixée aux temps 8, 12 et 16 semaines à laquelle est soustraite celle du témoin négatif.

Les résultats pour les matériaux neufs confirment que la promotion de la croissance microbienne est dépendante de la nature du matériau (tableau 2-7 et figures 2-12 et 2-13). La croissance la plus élevée est observée pour le matériau en polyéthylène réticulé PEX (1500 pg ATP/cm²) et les plus faibles trouvés pour le matériau en C-PVC (35 pg ATP/cm²), puis le matériau en cuivre (11 pg ATP/cm²). Ces essais montrent également l'absence d'impact des traitements répétés appliqués à ces trois matériaux sur leur aptitude à former des biofilms. Les teneurs en ATP par cm² sont proches entre le matériau neuf et le même matériau traité.

La flore aérobie revivifiable à 30° C initialement présente dans l'eau de trempage était constituée de cocci à Gram positif, difficilement identifiables, et de bacilles à Gram négatif, appartenant majoritairement au genre *Pseudomonas* et aux genres apparentés (*Comamonas*, *Delftia*, *Brevundimonas*, ...). La recherche de légionelles par *Polymerase Chain Reaction* a montré la présence de génomes de *Legionella* (1 500 UG/l) ; aucune *Legionella* n'a été détectée par culture. Il est à noter qu'il n'a pas été détecté par culture ou par PCR de bactéries ou de génomes de *Legionella pneumophila*.

Avec le cuivre, qu'il soit neuf ou traité, la flore revivifiable mise en évidence était constituée majoritairement de cocci à Gram positif. Les dénombrements ne sont pas significativement différents entre le matériau neuf et le matériau traité. Ainsi, après 16 semaines d'exposition, la concentration en bactéries dans l'eau était de l'ordre de $1,2 \cdot 10^4$ UFC/ml et sur les matériaux proche de $1,1 \cdot 10^3$ UFC/cm². Par ailleurs, il a été détecté par *Polymerase Chain Reaction* en temps réel, après 8 semaines d'incubation, la présence de génomes de *Legionella*, autres que *Legionella pneumophila*, à la concentration de 18 000 UG/L pour le matériau neuf et à un niveau non quantifiable pour le matériau traité ; ces génomes de *Legionella* n'ont pas été détectés par PCR aux autres temps. Des dosages en ions cuivre dans l'eau au contact du matériau ont donné des teneurs moyennes de 0,14 mg/l pour le matériau neuf et de 0,18 mg/l pour le matériau traité.



Etat de surface vu au MEB du C-PVC (a) (grossissement x 500), du PEX (b) (grossissement x 500) et du Cuivre (c) (grossissement x 500). En haut, matériau neuf, en bas, matériau après 120 cycles de traitement

Figure 2-11 : observations de l'état des surfaces, au microscope électronique à balayage, de différents matériaux avant et après 120 cycles de traitement

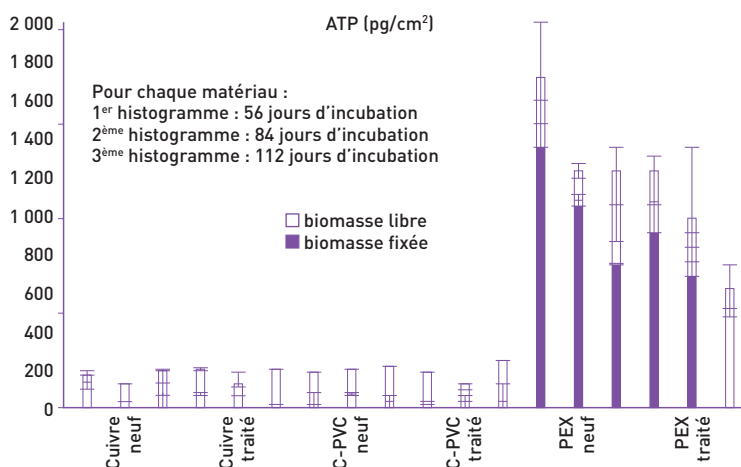


Figure 2-12 : Formation des biomasses sur les 3 matériaux neufs et "traités"

Le C-PVC était contaminé lors de la première analyse majoritairement par des cocci Gram positif qui ont disparu progressivement au profit de bacilles à Gram négatif. Après 16 semaines d'exposition, seules les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas* et genres apparentés) étaient détectées par culture. L'eau au contact du matériau contenait principalement des bacilles à Gram négatif, ceci aux trois temps d'analyse. La concentration en bactéries dans l'eau au contact du matériau neuf a été estimée à $1,8 \cdot 10^4$ UFC/ml et sur le matériau à $2,6 \cdot 10^4$ UFC/cm². Avec le matériau traité, la teneur en bactéries dans l'eau était proche de $3 \cdot 10^4$ UFC/ml et sur le matériau de l'ordre de $5,9 \cdot 10^4$ UFC/cm². La présence de génomes de *Legionella*, autres que *Legionella pneumophila*, a été mise en évidence par PCR en temps réel pour le matériau neuf. Le niveau de contamination le plus élevé a été observé lors de la première série d'expérience (3 600 UG/l) ; par la suite, la présence de génomes de *Legionella* est devenue non quantifiable. Avec le matériau traité, les génomes de *Legionella* ont été mis en évidence exclusivement lors de la première série d'expérience, et ceci, à un niveau non quantifiable.

Avec le PEX, qu'il soit neuf ou traité, les identifications ont donné des résultats analogues à ce qui était observé avec le C-PVC : disparition progressive sur les matériaux des cocci Gram positif au profit de bacilles à Gram négatif et présence majoritaire aux trois temps d'analyse de bactéries à Gram négatif dans l'eau au contact des matériaux. Les dénombrements bactériens dans l'eau pour le matériau neuf étaient voisins de $1,8 \cdot 10^4$ UFC/ml et sur le matériau, proches de $8,5 \cdot 10^4$ UFC/cm².

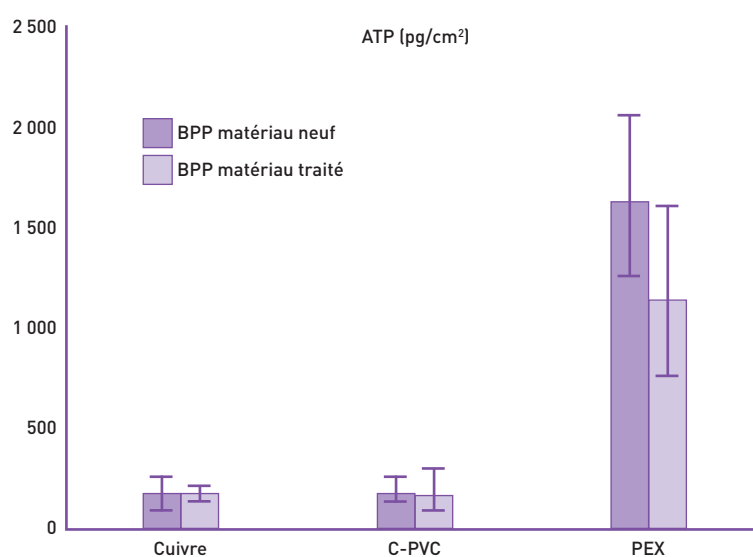


Figure 2-13 : Comparaison des BPP des matériaux neufs et "traités"

TABLEAU 2-7 : Biomasses produites sur les matériaux "neufs" et "traités"

Matériau	Biomasse totale (BP) (pg ATP/cm ²)	BPP (pg ATP/cm ²)
Cuivre "neuf"	151, $\sigma = 67$, VI = 44	11
Cuivre "traité"	156, $\sigma = 31$, VI = 20	16
C-PVC "neuf"	175, $\sigma = 46$, VI = 26	35
C-PVC "traité"	163, $\sigma = 98$, VI = 60	23
PEX "neuf"	1660, $\sigma = 403$, VI = 24	1 520
PEX "traité"	1113, $\sigma = 354$, VI = 32	973

σ = écart type, VI = variabilité intra-laboratoire = $\sigma \cdot 100 / BP$

Pour le matériau traité, la teneur en bactéries dans l'eau était estimée à $1,3 \cdot 10^4$ UFC/ml et sur le matériau, à $7,6 \cdot 10^4$ UFC/cm². Des génomes de *Legionella*, autres que *Legionella pneumophila*, ont été détectés pour le matériau neuf par PCR en temps réel. Le niveau de contamination le plus élevé a été obtenu lors de la première série d'ex-

périence (14 000 UG/l), la présence de génomes de *Legionella* diminuait par la suite pour atteindre un niveau non quantifiable. Sur le matériau traité, les génomes de *Legionella* ont été mis en évidence exclusivement lors de la première série d'expérience, et ceci à un niveau non quantifiable.

► Les études menées par le CRECEP et le LHVP ont permis d'évaluer l'aptitude à la croissance microbienne de différents matériaux, neufs et ayant subi des traitements répétés de nettoyage et de désinfection. Ces matériaux ont été soumis au test BPP, selon la méthode d'essai de la norme CEN TC164/WG3/AHG3 basée sur la détermination de la concentration en biomasse active, dans la phase eau et sur le matériau, par dosage de l'ATP microbien.

Les matériaux étudiés diffèrent entre eux par leurs propriétés de promotion de la croissance microbienne. La concentration de biomasse dans l'eau au contact de chaque matériau montre la même distribution que la concentration en biofilm sur le matériau.

Les ions cuivre sont connus pour présenter une toxicité envers les bactéries, ce qui pourrait expliquer la valeur de BPP très faible observée avec ce matériau. Le C-PVC, très peu promoteur de la croissance microbienne, présente une aptitude microbiologique équivalente à celle du cuivre réputé pour son potentiel à ne pas induire un développement microbien. La croissance la plus élevée est observée pour le polyéthylène réticulé (PEX) et le polypropylène : des valeurs de BPP supérieures à 1 000 pg ATP/cm² sont associées à des problèmes de recroissance microbienne dans les réseaux intérieurs. Le test BPP a révélé l'absence d'impact des traitements répétés appliqués au cuivre, C-PVC et PEX sur leur aptitude à former des biofilms, même s'il a été montré une légère attaque de la surface des matériaux. L'état des matériaux

traités correspond à des traitements répétés, représentatifs d'une durée de vie d'une installation intérieure à problèmes. Ces traitements successifs ne modifient probablement pas les propriétés des matériaux vis-à-vis de l'aptitude des micro-organismes à s'ancrer et proliférer. Toutefois, ce protocole expérimental ne tient que partiellement compte des modifications de structure liées au vieillissement du matériau dans des conditions réelles d'utilisation : état de surface, phénomènes d'entartrage et de corrosion.

Les dénombrements bactériens révèlent sur les matériaux neufs et traités une image moins claire que les valeurs de BPP, en raison probablement d'un nombre élevé de bactéries viables mais non cultivables. En effet, seule une toute petite fraction des micro-organismes dans les biofilms sont capables de se développer sur milieu de culture dans des conditions classiques de laboratoire. Les identifications microbiennes ont montré la présence majoritaire de cocci à Gram positif sur le cuivre, neuf ou traité, et de bacilles à Gram négatif (*Pseudomonas* et genres apparentés) sur le C-PVC et le PEX, neufs ou traités. La présence de génomes de *Legionella*, autres que *Legionella pneumophila*, a été détectée à un niveau quantifiable dans l'eau initiale de trempage et pour les trois matériaux neufs uniquement à la 8^{ème} semaine d'exposition. La présence de *Legionella* ne semble pas être corrélée à la densité des biomasses présentes puisque le cuivre et le PEX ont des concentrations proches en légionelles alors que seul le PEX apparaît comme matériau réellement promoteur de prolifération microbienne.

2.4 Comparaison des matériaux selon des méthodes dynamiques

Le degré de formation de biofilm sur les matériaux au contact de l'eau potable est testé dans des conditions hydrauliques correspondant à la situation d'installations domestiques (Kiwa).

Installations d'eau froide

Les conditions hydrauliques des réseaux de distribution d'eau des habitats individuels sont imitées dans un système dynamique en faisant alterner des périodes de brefs écoulements et d'arrêts d'eau. Les canalisations d'un diamètre interne d'environ 13 mm et d'une longueur de 5 m, faites des matériaux testés, sont branchées à l'eau de ville. Les raccords utilisés dans l'installation sont en acier inoxydable.

L'approvisionnement en eau, par une canalisation en PVC-U, est mis en route et arrêté, de manière répétée (21 fois en 24 heures). Dans ces conditions, environ 130 litres d'eau par jour, soit un débit de 260 ± 50 l/h, se sont écoulés dans chaque canalisation, à une température de $18,6 \pm 0,7^\circ \text{C}$, dans une température ambiante de $21,2 \pm 0,8^\circ \text{C}$.

Le système est inoculé par une culture de *Legionella* (cultivées dans de l'eau en présence de fragments de caoutchouc naturel), au début du test et après deux semaines. Les analyses microbiologiques des matériaux et de l'eau sont effectuées durant une période de 16 semaines.

Les caractéristiques de formation du biofilm de l'eau utilisée dans le système dynamique sont déterminées en utilisant un appareil spécifique (Van der Kooij *et al.* 1997). La concentration et le type de composés biodégradables présents dans l'eau contribuent à la formation du biofilm à la surface des matériaux des canalisations. Le taux de formation du biofilm (BFR) de l'eau est déterminé dans une colonne de verre verticale remplie d'anneaux de verre, placés l'un au-dessous de l'autre. L'eau s'écoule dans cette colonne du haut vers le bas à une vitesse de 0,2 m/s, correspondant au débit dans les réseaux de distribution. L'augmentation de la concentration en biofilm dans l'appareil est déterminée en retirant périodiquement deux anneaux de verre et en mesurant la quantité d'ATP. Le taux de formation de biofilm ($\text{pg ATP/cm}^2, \text{ jour}$) est défini comme l'accroissement linéaire du contenu en ATP du biofilm comme une fonction du temps sur une période comprise entre 0 et 100 jours.

Les matériaux choisis pour les tests avec le système dynamique sont présentés sur le tableau 2-8.

TABLEAU 2-8 : Matériaux choisis pour les tests avec le système dynamique "eau froide"

Matériau	Sigle	Diamètre extérieur (mm)	Diamètre intérieur (mm)
Acier inoxydable 316	RVS	18	16
Cuivre	Koper	15	13
Polychlorure de vinyle surchloré	C-PVC	16	12
Polyéthylène réticulé	PE-Xa	16	11,5
Polypropylène	PP-R	16	10,5
Polyéthylène renforcé par une feuille interne d'aluminium	Al / PE-MD	16	12

Dans le système dynamique développé par le Kiwa, le taux de formation de biofilm, sur la période d'essai de 140 jours, est aussi bas que 2 pg ATP/cm² par jour pour l'ensemble des matériaux. Ces valeurs relativement faibles sont probablement la conséquence de l'alternance de périodes d'arrêt et d'écoulements d'eau. Les concentrations les plus importantes de biofilm sont observées sur les matériaux en polyéthylène (PE) et sur le cuivre (240 pg ATP/cm²) et les concentrations les plus faibles sur le C-PVC (80 pg ATP/cm²), l'acier inoxydable (RVS) et le polypropylène (PP-R) (figure 2-14).

Après 28 jours d'essai, une concentration relativement élevée de biofilm est déjà observée sur le cuivre et le polyéthylène. Après une période d'essai de 140 jours, aucun équilibre n'a été atteint pour la plupart des matériaux.

Des numérations bactériennes significativement élevées sont retrouvées sur le polyéthylène renforcé par une feuille interne d'aluminium (2 500 UFC/cm²) à l'inverse des autres matériaux testés. Les numérations bactériennes montrent une tendance à la diminution sur la période d'essai de 140 jours.

La quantité de biomasse formée sur la surface du matériau au contact de l'eau dépend de plusieurs

processus : relargage de composés biodégradables par le matériau et leur apport par l'eau, mort microbienne et libération de la biomasse par le flux d'eau. Le relargage des composés biodégradables par les matériaux dans le système dynamique est probablement plus faible que dans le test BFP, car la température de l'eau est plus basse (18,6° C) que dans le test BFP qui est effectué à 25° C.

Installation d'eau chaude

Deux canalisations d'une longueur de 5,9 mètres de chacun des matériaux étudiés (inox 316, diamètre 16 mm ; cuivre désoxydé, diamètre 13 mm ; polyéthylène, diamètre 12 mm) sont reliées séparément à trois chauffe-eau électriques identiques, d'un volume de 30 litres, par une canalisation en C-PVC (longueur 1,6 m ; diamètre 20 mm). Quatre segments de canalisations, chacun d'une longueur de 15 cm, sont installés près du robinet de chacune des canalisations testées pour l'analyse de biofilm. Une pompe assure la recirculation de l'eau chaude par un circuit en C-PVC (longueur 1,2 m, diamètre 20 mm).

L'utilisation domestique d'eau chaude est simulée de la manière suivante : toutes les 24 heures, un volume total de 81 litres d'eau traverse chacune des canalisations des matériaux testés. Des échantillons d'eau de 500 ml sont recueillis une fois par semaine à chacun des deux robinets, et de temps en temps, sur les chauffe-eau.

Les substances accumulées sur la surface intérieure des segments de canalisations sont prélevées à l'aide d'écouvillons stériles qui sont ensuite placés chacun dans 10 ml d'eau du robinet autoclavée. Les analyses chimiques et bactériologiques sont effectuées sur une suspension de 40 ml après sonication à basse énergie de 2 minutes.

Dans un premier temps, chaque chauffe-eau et les canalisations correspondantes sontensemencés avec 10 ml d'un mélange microbien, incluant une souche de *Legionella pneumophila*, mise en culture dans de l'eau en présence de segments de polyéthylène. L'eau chaude circule dans la boucle pour permettre aux micro-organismes de se multiplier dans le système. L'ensemencement est répété à J 18 et J 28 avec de l'eau chaude provenant d'une installation industrielle. L'eau est remplacée à J 37, J 64 et J 71.

Durant la période d'ensemencement du système (79 jours), la température de l'eau est comprise entre 25° C et 35° C (médiane 30° C). Les valeurs de pH sont de 8,1 ± 0,3 (cuivre), 7,8 ± 0,2 (inox

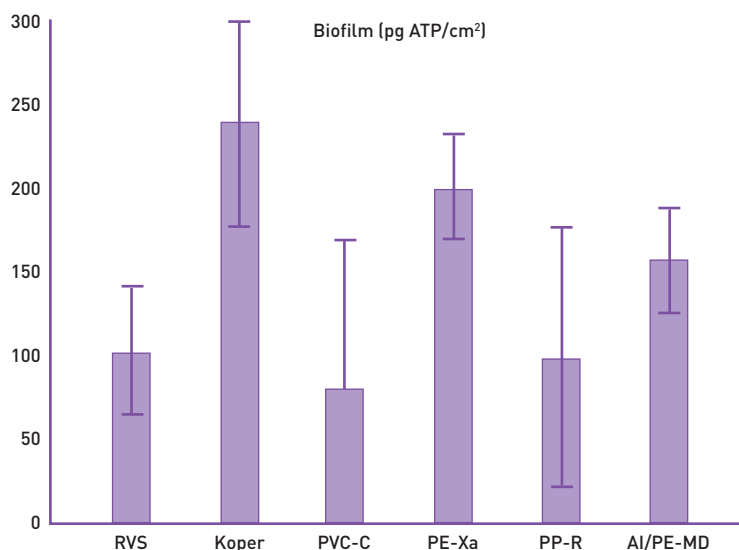


Figure 2-14 : concentrations moyennes de biofilm (en pg ATP/cm²) sur les matériaux dans le système dynamique

TABLEAU 2-9 : concentrations en biomasse et en *Legionella* dans l'eau prélevée dans le système expérimental d'eau chaude domestique

Matériau de canalisation	Biomasse ^a (ng ATP/L)			<i>Legionella</i> ^b (UFC/L)			<i>Legionella</i> /ATP (UFC/ng)		
	P10	Médiane	P90	P10	Médiane	P90	P10	Médiane	P90
Cu-1	1.1	2.1	5.6	33	1 665	5 330	0.02	0.7	3.1
Cu-2	1.1	1.8	5.9	133	1 400	10 800	0.07	0.8	5.2
Inox-1	1.3	2.5	6.3	< 33	2 000	22 000	0.01	0.6	11
Inox-2	1.3	2.4	6.4	665	5 700	26 300	0.05	2.7	15
PEX-1	2.2	4.5	20	70	2 870	17 000	0.01	0.8	3.1
PEX-2	2.2	4.1	17	400	5 930	21 000	0.04	1.0	5.4

^an = 83 • ^bn = 80 (Cu-1), 79 (Cu-2), 77 (PEX-1), 80 (PEX-2), 80 (inox)

316) et $7,9 \pm 0,3$ (polyéthylène). La concentration en cuivre dans l'eau atteint des valeurs de 2 - 4 mg/l dans les canalisations en cuivre et de $0,07 \pm 0,2$ mg/l dans les canalisations en inox et en polyéthylène. Les concentrations d'ATP dans l'eau atteignent des valeurs de 500 ng/l en quelques jours et diminuent jusqu'à 20 - 50 ng/l après deux semaines. Ensuite, une augmentation progressive est observée avec des valeurs de 300 - 400 ng/l après 50 jours pour l'inox et le polyéthylène et de 40 ng/l pour le cuivre. Les valeurs médianes d'ATP sont de 30 ng/l (cuivre), 50 ng/l (inox) et 60 ng/l (polyéthylène). Les numérations de la flore aérobie revivifiable reflètent les observations pour l'ATP : $8,5 \cdot 10^3$ UFC/ml (cuivre), $2,4 \cdot 10^4$ UFC/ml (inox) et $5 \cdot 10^4$ UFC/ml (polyéthylène). Les concentrations en *Legionella* atteignent les valeurs maximales de $2 \cdot 10^5$ UFC/L pour le cuivre et l'inox et $2 \cdot 10^6$ UFC/L pour le polyéthylène.

Qualité de l'eau du système

L'utilisation d'eau chaude débute à J 80. A partir de J 210, l'eau des chauffe-eau est chauffée à 70° C durant 30 minutes deux fois par semaine pour prévenir la multiplication des *Legionella* et cette eau est éliminée par le fond du ballon. La

température de l'eau circulant dans les canalisations testées est fixée à 37° C.

Après un jour de simulation de l'utilisation domestique d'eau chaude, les concentrations d'ATP chutent à des valeurs inférieures à 10 ng/l et on observe une diminution de 10 fois des concentrations en *Legionella*. A J 120, les concentrations en *Legionella* dans l'eau atteignent des valeurs de 10^4 UFC/l pour tous les matériaux testés et s'accroissent jusqu'à $4 \cdot 10^4$ UFC/l pour le cuivre et 10^5 UFC/l pour l'inox et le polyéthylène. Ainsi, l'utilisation d'eau domestique d'eau chaude ne fait pas disparaître la bactérie du système. Les échantillons d'eau recueillis directement dans les chauffe-eau révèlent que les *Legionella* se sont multipliées. L'élévation de la température de l'eau des chauffe-eau à 70° C durant 30 minutes deux fois par semaine réduit les concentrations en *Legionella* dans l'eau du chauffe-eau jusqu'au seuil de détection analytique (33 UFC/L).

De J 210 à J 857, l'utilisation d'eau chaude domestique est simulée dans le système avec élévation de la température dans les chauffe-eau à 70° C deux fois par semaine durant 30 minutes. La température de l'eau des canalisations testées est

de $33 \pm 4^\circ \text{C}$. A J 342, les canalisations cuivre-1, inox-1 et polyéthylène-1 sont rincées à l'eau à 70°C durant 30 minutes. A J 552, toutes les canalisations sont rincées plusieurs heures à l'eau à 70°C . Immédiatement après, l'eau est recirculée dans le système à 37°C durant 14 jours.

La concentration de biomasse active (ATP) dans l'eau des canalisations est restée au-dessous de 5 ng/l et excède rarement 10 ng/l. Les valeurs médianes des concentrations d'ATP sont de 2,1 ng/l (cuivre), 2,5 ng/l (inox) et de 4,5 ng/l (polyéthylène) avec des valeurs similaires pour les deux canalisations testées de chaque matériau (tableau 2-9). Une analyse statistique (variance) révèle que les concentrations d'ATP dans l'eau sont significativement différentes ($p < 0,05$) pour les matériaux étudiés.

La présence permanente de *Legionella* dans l'eau démontre la capacité de cette bactérie à se multiplier dans les canalisations dans des conditions d'utilisation domestique. Les concentrations en *Legionella* vont de valeurs inférieures au seuil de détection analytique ($< 33 \text{ UFC/l}$) jusqu'à plus de 10^4 UFC/l . Aucune *Legionella* n'est observée directement après le rinçage des canalisations-1 avec de l'eau à 70°C à J 342 mais la présence de *Legionella* est observée après 2 mois (polyéthylène), 3 mois (cuivre) et 4 mois (inox). A J 552, après rinçage des canalisations avec de l'eau à 70°C suivie d'une recirculation de l'eau durant deux semaines, les concentrations en *Legionella*

vont de $1,3 \cdot 10^6 \text{ UFC/l}$ à $2,7 \cdot 10^7 \text{ UFC/l}$. Dans ces échantillons d'eau, sont observées des concentrations élevées d'ATP : 73-160 ng/l (cuivre), 170 ng/l (inox) et 300 ng/l (polyéthylène). Après une semaine d'utilisation de l'eau, les concentrations en *Legionella* et ATP diminuent à des niveaux observés avant le chauffage de l'eau.

Les concentrations en *Legionella* dans l'eau des canalisations en inox et en polyéthylène sont plus de 10 fois plus élevées que celles dans l'eau des canalisations en cuivre (tableau 2-9). Après 760 jours, les concentrations en *Legionella* sont au même niveau pour tous les matériaux. L'analyse de la variance révèle que sur une période de 2 ans d'étude, les concentrations en *Legionella* dans l'eau des canalisations en cuivre sont significativement différentes ($p < 0,05$) que celles dans l'eau des autres canalisations (inox et polyéthylène).

Formation de biofilm sur les canalisations

Les concentrations médianes de biomasse sur la surface intérieure des segments de canalisations, prélevés à la fin ou juste après la période de recirculation, sont similaires pour le cuivre et l'inox (environ 630 pg ATP/cm^2) et de $1\,810 \text{ pg ATP/cm}^2$ pour le polyéthylène (tableau 2-10). Les niveaux de concentrations sont maintenus sur les canalisations en cuivre et en inox, mais des concentrations plus élevées sont retrouvées sur le polyéthylène après le démarrage de l'utilisation domestique d'eau chaude.

TABLEAU 2-10 : concentrations en biomasse et en *Legionella* dans le biofilm sur les matériaux dans le système expérimental d'eau chaude domestique

Matériau de canalisation	Biomasse ^a (pg ATP/cm ²)		<i>Legionella</i> ^b (UFC/cm ²)		<i>Legionella</i> /ATP (UFC/pg)				
	P10	Médiane	P90	P10	Médiane	P90	P10	Médiane	P90
Cu	310	720	1 520	1	40	2 500	0.001	0.09	2.9
Inox	340	635	1 405	150	1 020	8 220	0.14	1.4	21
PEX	725	1810	2 615	65	3 700	15 225	0.05	2.1	7.9

^an = 47 (Cu), 41 (inox), 41 (PEX)

2.5 Autres études publiées

Les concentrations en biofilm sur des morceaux de canalisations à J 542 (cuivre seul) et à J 857 confirment les effets des matériaux sur le développement de biofilm. Pour le polyéthylène, il est calculé un taux de formation de biofilm (BFR) de $2,8 \pm 0,4$ ($r^2 = 0,86$) pg ATP ($\text{cm}^2 \cdot \text{jour}$). Les concentrations de biomasse fixée sont plus élevées que celles de l'eau des canalisations. Les valeurs indicatives pour ces ratios sont respectivement de 260 (inox), 320 (cuivre) et 430 (polyéthylène) cm^{-1} .

L'élévation périodique de température à 70° C dans les chauffe-eau ne prévient pas la formation de biofilm : des concentrations de 1 900 pg ATP/ cm^2 (haut et milieu) et de 2 800 pg ATP/ cm^2 (bas) sont retrouvées sur la surface interne du chauffe-eau.

Les numérations de la flore aérobie revivable dans les biofilms sont de $4,4 \pm 0,2 \log_{10}$ (cuivre), $4,2 \pm 0,4 \log_{10}$ (inox) et $4,7 \pm 0,6 \log_{10}$ (polyéthylène) UFC/ cm^2 et seul le polyéthylène montre des valeurs qui excèdent 10^5 UFC/ cm^2 . Ces valeurs confirment en général les différences observées avec les concentrations d'ATP sur les matériaux, mais aucune corrélation n'est observée entre les valeurs d'UFC et les concentrations d'ATP.

Les concentrations en *Legionella* dans les biofilms dépendent du type de matériau. Les valeurs les plus basses sont observées avec le cuivre et les plus élevées avec le polyéthylène (tableau 2-10). Les concentrations en *Legionella* s'accroissent sur les segments de cuivre avec le temps d'exposition. A J 857, les concentrations des morceaux de canalisations sont au même niveau pour les différents matériaux. Les valeurs médianes du ratio *Legionella*/ATP dans le biofilm ressemblent à ceux observés dans l'eau pour l'inox et le polyéthylène mais une valeur beaucoup plus basse est obtenue avec le cuivre.

La concentration en cuivre dans l'eau froide est dans la majorité des cas inférieure à 10 $\mu\text{g/l}$. La concentration en cuivre dans l'eau chaude des canalisations en inox et en polyéthylène est de 30 à 40 $\mu\text{g/l}$, indiquant que du cuivre est libéré à partir du serpentin de chauffage. La concentration en cuivre dans l'eau chaude des canalisations en cuivre est comprise entre 200 et 700 $\mu\text{g/l}$ (moyenne 370 $\mu\text{g/l}$). Les composés de cuivre sur la surface de segments de canalisations en cuivre s'accumulent initialement de manière linéaire avec le temps mais les concentrations sur les morceaux de canalisations testées à J 542 et J 857 suggèrent une diminution de l'accumulation. Les concentrations en cuivre restent au-dessous de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les canalisations en inox et en polyéthylène.

Les encadrés suivants présentent quelques études comparatives réalisées dans des conditions statiques et dynamiques.

Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials

> Diversité microbienne des biofilms sur des canalisations de distribution d'eau de différents matériaux
Yu J., Kim D. and Lee T. - 2010

Afin d'étudier l'influence de différents matériaux de canalisations sur la formation de biofilm, six matériaux classiquement utilisés pour les réseaux domestiques de distribution d'eau sont choisis : trois métaux traditionnels tels que le cuivre, l'inox et l'acier inoxydable et l'acier recouvert de zinc (acier galvanisé), et trois matériaux plastiques tels que le polychlorure de vinyle surchloré, le polybutène et le polyéthylène. Des canalisations neuves de chacun de ces six matériaux sont découpées selon la même taille (diamètre de 3 cm et longueur de 2 cm). Ces coupons sont ensuite nettoyés 3 fois avec une solution d'éthanol et d'eau distillée (70 % v/v) et séchés pour éliminer bactéries et impuretés.

*Pour l'évaluation du pouvoir de formation de biofilm (BFP) et de la diversité microbienne, chaque coupon est incubé dans trois flacons d'un litre renfermant trois types d'eau : (i) eau du robinet (aucun coliforme/100 ml, chlore < 250 mg/l, turbidité < 0,5 NFU et nitrates < 10 mg/l) (ii) eau mixte avec 0,9 l d'eau du robinet mélangée à 0,1 l d'eau de rivière comme source de micro-organismes (iii) eau du robinet inoculée avec une culture d'*Escherichia coli* (4×10^6 UFC/ml) représentant les bactéries coliformes. Les flacons contenant les coupons sont incubés dans l'obscurité à $25 \pm 1^\circ \text{C}$ durant 90 jours.*

Les duplicatas des coupons de chacun des 6 flacons sont transférés dans un tube de 50 ml contenant une solution de sodium pyrophosphate 0,1 % (30 ml).

Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of

Les biofilms présents sur les coupons sont détachés par vortex durant 5 minutes et centrifugés à 3 000 g durant 3 minutes. Le surnageant est retiré et le culot de centrifugation est remis en suspension dans 1 ml d'eau distillée. Cet échantillon est utilisé pour le dosage d'adénosine tri-phosphate (ATP), l'analyse des *Escherichia coli* et l'extraction d'acide désoxyribonucléique (ADN).

L'ATP présent dans l'échantillon est dosé afin de mesurer la concentration de biomasse active (BFP) après différentes périodes d'incubation. L'échantillon est aussi ensemencé, après dilutions, sur une gélose LB (Lysogeny Broth) et incubé à 37° C durant 24 heures pour la recherche et le dénombrement d'*Escherichia coli*. Des coupons de 1 x 1 cm² sont préparés, avant et après incubation dans l'eau mixte durant 90 jours, pour une lecture en microscopie électronique à balayage. L'échantillon est enfin centrifugé à 10 000 g à 4° C durant 10 minutes et le culot remis en suspension dans 100 µl d'eau distillée pour l'extraction des ADN

de l'ensemble des bactéries. Les ADN extraits sont utilisés pour l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) des fragments génétiques 16S rADN qui sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les résultats

Le tableau 2-11 présente les BFP pour chacun des matériaux, incubés dans de l'eau du robinet et dans de l'eau du robinet mélangée à de l'eau de rivière.

Dans de l'eau du robinet incubé durant 90 jours, le plus faible BFP est mesuré sur le cuivre (30 pg ATP/cm²) et le plus élevé sur l'acier galvanisé (300 pg ATP/cm²). L'acier inoxydable montre un taux intermédiaire (158 pg ATP/cm²), similaire au polyéthylène (138 pg ATP/cm²) et au polybutène (185 pg ATP/cm²). Le C-PVC a une valeur de BFP deux fois moindre que celle des autres matériaux plastiques.

TABLEAU 2-11 : concentrations d'ATP des biofilms sur différents types de matériaux de canalisations après 90 jours d'incubation dans de l'eau du robinet (et dans une eau mélangée à de l'eau de rivière)

Pouvoir de formation de biofilm (BFP) en pg ATP/cm ²	Incubation dans l'eau du robinet durant 90 jours	Incubation dans l'eau du robinet (+ eau de rivière) durant 90 jours
Cuivre	30	114
Acier inoxydable	158	410
Acier galvanisé	300	474
C-PVC	90	190
Polybutène	185	300
Polyéthylène	138	310

XTABLEAU 2-12 : Numérations d'*Escherichia coli* des biofilms sur des matériaux de canalisations après 90 jours d'incubation dans de l'eau du robinet inoculée avec *E.coli*

Pouvoir de formation de biofilm (BFP) en UFC <i>Escherichia coli</i> /cm ²	Incubation dans l'eau du robinet inoculée par <i>E. coli</i> durant 90 jours
Cuivre	0,3 x 10 ³
Acier inoxydable	3,9 x 10 ³
Acier galvanisé	5,2 x 10 ³
C-PVC	0,4 x 10 ³
Polybutène	2,5 x 10 ³
Polyéthylène	2,4 x 10 ³

Les valeurs de BFP pour les matériaux incubés dans de l'eau du robinet mélangée à de l'eau de rivière sont plus élevées en raison de l'apport de micro-organismes par l'eau de rivière. Toutefois, les valeurs ont les mêmes tendances pour les deux types d'eau. La valeur de BFP la plus faible est observée pour le cuivre (114 pg ATP/cm²), mais les deux aciers montrent des valeurs supérieures à 400 en pg ATP/cm². Les matériaux plastiques ont des valeurs autour de 300 pg ATP/cm², sauf pour le C-PVC, qui a une valeur basse, inférieure à 200 pg ATP/cm².

Les numérations en UFC/cm² d'*Escherichia coli* sur les matériaux montrent des tendances similaires à celles des dosages d'ATP pour les matériaux incubés dans de l'eau du robinet et dans le mélange eau du robinet - eau de rivière (tableau 2-12).

Les deux aciers montrent des valeurs élevées en UFC, à plus de 4,0 x 10³ UFC/cm² alors que les

matériaux plastiques, polybutène et polyéthylène, montrent des valeurs intermédiaires. Les numérations UFC du cuivre et du C-PVC sont voisines et très basses.

Les observations en microscopie électronique à balayage des matériaux neufs avant l'incubation indiquent que ces matériaux ont des structures de surface variables qui peuvent influencer la formation de biofilm. Les observations après incubation durant 90 jours dans le mélange eau du robinet - eau de rivière montrent la présence de quantités différentes de micro-organismes avec des morphologies variables selon le type de matériau. Une quantité relativement faible de micro-organismes est observée sur le C-PVC et le cuivre, qui semblent avoir des surfaces lisses. Toutefois, le polybutène et le polyéthylène montrent sur leurs surfaces des quantités importantes de micro-organismes bien qu'ils aient aussi des surfaces relativement lisses. Les aciers, qui ont des surfaces rugueuses, sont tous les deux recouverts d'une

Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of

quantité importante de micro-organismes, mais, avec des morphologies différentes selon le type d'acier.

Ces résultats suggèrent que les structures de surface semblent être le facteur principal de formation du biofilm sur les matériaux métalliques. Toutefois, dans le cas des matériaux plastiques, la croissance bactérienne pourrait être affectée non pas uniquement par les structures de surface mais aussi par le relargage de composés utilisés par quelques micro-organismes spécifiques.

Les profils électrophorétiques des fragments 16S rADN, amplifiés à partir de l'ADN total des biofilms sur les matériaux, sont comparés. Les matériaux montrent différents profils, mais plusieurs bandes, telles que les bandes 2, 8 et 9, sont détectées dans la plupart des matériaux. Basées

sur le nombre et l'intensité des bandes de chaque profil, la richesse et la diversité microbienne sont calculées pour chaque matériau (tableau 2-13).

Les matériaux plastiques, tels que le polybutène et le polyéthylène, montrent une plus grande richesse en phylotypes que les matériaux métalliques, acier inoxydable et acier galvanisé, dans les deux types d'eau ; un résultat opposé aux données ATP et UFC. Le cuivre révèle une richesse relativement faible en phylotypes, et le C-PVC a la richesse la plus faible dans les deux types d'eau d'incubation.

Les indices de diversité suivent ces mêmes tendances. Le C-PVC montre la diversité bactérienne la plus faible dans les biofilms, mais dans l'analyse ATP, le cuivre montre la plus faible valeur. Ceci suggère que le nombre de types bactériens pouvant se développer à la surface du C-PVC est moindre

TABLEAU 2-13 : richesse et diversité des phylotypes bactériens des communautés bactériennes des biofilms présents sur les coupons des différents matériaux incubés dans différents types d'eau

Types d'eau pour incubation	Matériau	Richesse		Diversité	
		S*	H**	D***	
Eau du robinet	Cuivre	6	2.4	0.8	
	Acier inoxydable	5	1.6	0.6	
	Acier galvanisé	8	2.8	0.8	
	C-PVC	3	1.5	0.6	
	Polybutène	7	2.6	0.8	
	Polyéthylène	9	2.8	0.8	
Eau du robinet + eau de rivière	Cuivre	5	2.3	0.8	
	Acier inoxydable	9	2.9	0.9	
	Acier galvanisé	8	2.7	0.8	
	C-PVC	3	1.5	0.6	
	Polybutène	14	3.6	0.9	
	Polyéthylène	9	2.6	0.8	

* richesse en phylotypes

** index de diversité Shannon-Weiner

*** index de diversité de Simpson

different materials

que sur le cuivre, tandis que plusieurs types de bactéries peuvent être présentes dans les biofilms à la surface du cuivre, bien que leurs activités pourraient être inhibées par le cuivre. Ainsi, le BFP plus faible pour le C-PVC semble provenir de sa surface lisse, et non du relargage de composés chimiques.

Une analyse statistique des composants principaux révèle que, dans le cas des matériaux métalliques, la communauté microbienne de chaque matériau incubé dans l'eau du robinet est proche de celle de ce matériau incubé dans l'eau mélangée. Il en est de même pour le C-PVC, ce qui indique qu'un nombre très limité de types de bactéries peuvent former un biofilm à la surface du C-PVC. Toutefois, les communautés microbiennes des biofilms sur les matériaux plastiques, tels que le polybutène et le polyéthylène, incubés dans l'eau du robinet sont éloignées de celles de l'eau mélangée, signifiant que des types variés de bactéries peuvent se développer et former des biofilms sur ces matériaux.

L'analyse de la séquence ADN du profil électrophorétique montre une diversité de bactéries, relevant principalement des α - et β -protéobactéries, bacteroidetes et actinobactéries. Les bandes 2, 8 et 9, sont détectées sur tous les types de matériaux. La bande 2 avec une forte intensité est étroitement associée à la bactérie non cultivable, Dechloromonas sp., comprise dans le groupe des β -protéobactéries. Le groupe Dechloromonas est une des nombreuses bactéries réduisant le perchlorate et le chlorate isolées d'une grande diversité d'environnements et prédominante dans les communautés microbiennes des biofilms se développant en présence de résiduels de chloramines. La séquence 16S rADN de la bande 8 correspond à une bactérie non cultivable détectée dans un réservoir d'une usine d'énergie hydraulique, et la bande 9 est proche d'espèces relevant du groupe des actinobactéries.

D'autres bandes ont été trouvées dans un petit nombre de matériaux. Les bandes 1 et 4 sont seulement détectées sur les échantillons

de polybutène. La bande 1 montre 100 % de similitude avec Brevundimonas intermedia relevant des α -protéobactéries. Les espèces de Brevundimonas sont trouvées dans les eaux douces et marines avec des niveaux faibles de nutriments. La bande 4 montre une séquence ayant 100 % d'homologie avec Sphingomonas phyllosphaerae relevant des α -protéobactéries. Sphingomonas est isolé des systèmes de distribution d'eau potable et il est bien connu que ces espèces peuvent survivre à la chloration en formant des agrégats bactériens. La bande 3, détectée sur les échantillons de polybutène et de polyéthylène, est très proche de Methylophilus sp. relevant des β -protéobactéries. Cette bactérie a été isolée d'une source d'eau souterraine pour un réseau municipal de distribution d'eau.

La bande 5 a une homologie parfaite avec Pandoraea sp. qui est une des diverses ultramicrocellules viables récemment isolées de l'eau du robinet par culture avec des canalisations en chlorure de polyvinyle (PVC). Dans cette étude, toutefois, la bande 5 a été trouvée avec les matériaux en acier. La bande 6 est associée avec le pathogène opportuniste Mycobacterium sp.

Lors du choix d'un matériau de canalisation pour un système de distribution d'eau potable, il devrait être considéré que certains matériaux plastiques avec des structures de surface très lisses, comme celles du C-PVC, sont adaptés à des applications de plomberie en raison de leur faible potentiel de formation de biofilm et de la faible diversité microbienne dans le biofilm, comparable à ceux du cuivre.

L'analyse des communautés microbiennes a aussi apporté des informations fondamentales à la compréhension de la formation du biofilm dans les systèmes de distribution d'eau potable.

Influence of temperature and plumbing material selection on potable water system containing complex microbial flora

➤ *Influence de la température et du choix du matériau de canalisation sur la formation du biofilm et la croissance de Legionella pneumophila dans un pilote de système d'eau potable contenant une flore microbienne complexe. Rogers J. et al. - 1994*

Deux récipients en verre, d'un volume de 500 ml, sont reliés pour simuler des conditions d'un système de distribution d'eau (pilote "biofilm" à deux étages). Le premier récipient simule un réservoir de stockage, le débit d'eau stérile produisant un taux de dilution de 0,05 par heure. Afin d'assurer la reproductibilité des essais, les conditions dans ce récipient restent constantes, sans introduction d'aucun matériau de canalisation. Le premier récipient est la source de contamination (sédiments d'un ballon d'eau chaude renfermant une souche virulente de Legionella pneumophila séro-groupe 1 Pontiac) qui fournit un inoculum constant au second récipient, qui représente le système de distribution d'eau et est utilisé pour la formation du biofilm. De l'eau stérile est ajoutée au récipient générant le biofilm pour produire un taux de dilution final de 0,2 par heure. L'effluent du second récipient est pompé dans un flacon. La température du premier récipient, source de la contamination, est maintenue à $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$.

Des tubes de polybutène, cuivre et C-PVC sont découpés pour obtenir des coupons de 1 cm^2 de surface interne ; un trou de 1mm est percé pour les suspendre dans le second flacon avec un fil de cuivre ou de titane (dans le cas du polybutène et du C-PVC). Ces coupons sont nettoyés dans l'acétone pour éliminer toute trace de salissure ou d'huile et stérilisés à l'autoclave. Les analyses des coupons, après agitation dans 10 ml d'eau distillée stérile durant 3 jours, montrent qu'ils libèrent moins de $6 \mu\text{g}$ de carbone organique total. Les coupons de cuivre sont placés durant 14 jours dans 200 ml d'eau du robinet stérile afin d'oxyder les surfaces et de

limiter le relargage de fortes quantités d'ions cuivre dans le pilote expérimental.

Un seul coupon de matériau est utilisé à chaque essai et la colonisation est étudiée à des températures de 20, 40, 50 et 60°C . Pour chacun des essais, le matériau et la surface de verre témoin sont immergés de manière aseptique dans le second récipient. Les coupons sont retirés après 1, 4, 7, 14 et 21 jours. Afin de s'assurer que toutes les bactéries planctoniques ont été enlevées, les coupons sont lavés par immersion complète dans 10 ml d'eau stérile avec un léger mouvement. Le biofilm est ensuite décroché en grattant méthodiquement toute la surface interne du coupon à l'aide d'un écouvillon stérile. Les biofilms sont remis en suspension dans 1,0 ml d'eau stérile et vortexés durant 30 secondes pour disperser les bactéries.

Les populations bactériennes, autres que les légionelles, sont dénombrées sur une gélose R2A, non sélective et faiblement nutritive afin d'éviter le choc lié au substrat. Ces milieux sont incubés durant 7 jours à 30°C et à la même température que celle de l'essai. Dans tous les cas, les nombres les plus élevés d'UFC dénombrées sur les géloses incubées à 30°C sont utilisés pour déterminer la flore totale non-Legionella. Des géloses BCYE et des géloses BCYE supplémentées en glycine, vancomycine, polymyxine, et cycloheximide (GVPC) sont utilisées pour déterminer le nombre de bactéries les plus fastidieuses y compris Legionella pneumophila. Ces géloses sont incubées à 30°C durant 7 jours.

Une gélose de chaque milieu de culture qui contient 30 à 100 colonies, et sur laquelle la morphologie des colonies peut être distinguée, a été choisie pour évaluer les profils des populations bactériennes pour

biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model

chaque biofilm à chaque âge. Chaque type de colonie est cultivée trois fois sur les milieux R2A et BCYE avant identification appropriée par les systèmes d'identification bactérienne.

Les coupons sont examinés en microscopie électronique à balayage, microscopie optique et microscopie à interférence différentielle.

Les concentrations de cuivre sont mesurées dans les échantillons planctoniques et de biofilm.

Les résultats

Les résultats sont présentés sur le tableau 2-14 (flore bactérienne non-*Legionella*) et sur le tableau 2-15 (*Legionella pneumophila*).

TABLEAU 2-14 : comparaison de la colonisation par la flore bactérienne non-*Legionella* de différents matériaux de canalisations, du verre témoin et de la phase planctonique, à différentes températures

Température et matériau	Valeurs moyennes de la flore bactérienne non- <i>Legionella</i> (1 à 21 jours)			
	sur la surface du matériau (UFC/cm ²)	sur la surface du verre témoin (UFC/cm ²)	dans la phase planctonique (UFC/ml)	ratio de colonisation
20°C				
Cuivre	2,16 x 10 ⁵	3,08 x 10 ⁵	3,79 x 10 ⁴	1
Polybutène	5,70 x 10 ⁵	6,23 x 10 ⁵	2,87 x 10 ⁵	2.6
C-PVC	1,81 x 10 ⁶	5,05 x 10 ⁵	2,63 x 10 ⁵	8.4
40°C				
Cuivre	8,04 x 10 ⁴	6,66 x 10 ⁴	9,18 x 10 ⁴	1
Polybutène	1,18 x 10 ⁶	4,43 x 10 ⁵	4,30 x 10 ⁴	14.7
C-PVC	3,67 x 10 ⁵	1,40 x 10 ⁵	3,68 x 10 ⁵	4.6
50°C				
Cuivre	2,26 x 10 ⁴	1,20 x 10 ⁵	2,40 x 10 ⁴	1
Polybutène	3,21 x 10 ⁶	1,50 x 10 ⁶	8,43 x 10 ⁴	142
C-PVC	1,22 x 10 ⁵	3,78 x 10 ⁵	6,43 x 10 ⁴	5.4
60°C				
Cuivre	4,47 x 10 ²	6,29 x 10 ²	1,83 x 10 ³	1
Polybutène	4,25 x 10 ⁴	1,25 x 10 ⁴	5,84 x 10 ³	95
C-PVC	5,19 x 10 ³	1,78 x 10 ⁴	6,06 x 10 ⁴	11.6

Influence of temperature and plumbing material selection on potable water system containing complex microbial flora

TABLEAU 2-15 : comparaison de la colonisation par *Legionella pneumophila* de différents matériaux de canalisations, du verre témoin et de la phase planctonique, à différentes températures

Température et matériau	Valeurs moyennes des numérations de <i>Legionella pneumophila</i> (1 à 21 jours)			
	sur la surface du matériau (UFC/cm ²)	sur la surface du verre témoin (UFC/cm ²)	dans la phase planctonique (UFC/ml)	ratio de colonisation
20°C				
Cuivre	≤ 10	≤ 10	3,00 x 10 ⁰	
Polybutène	6,65 x 10 ²	2,79 x 10 ²	1,28 x 10 ²	665
C-PVC	2,13 x 10 ³	4,69 x 10 ³	2,81 x 10 ²	2.132
40°C				
Cuivre	1,67 x 10 ³	7,89 x 10 ²	8,17 x 10 ²	1
Polybutène	1,12 x 10 ⁵	1,59 x 10 ⁴	2,20 x 10 ³	56.8
C-PVC	6,84 x 10 ⁴	4,64 x 10 ³	2,20 x 10 ³	34.7
50°C				
Cuivre	≤ 10	2,00 x 10 ⁰	1,70 x 10 ¹	1
Polybutène	8,58 x 10 ²	3,31 x 10 ¹	1,18 x 10 ²	868
C-PVC	6,00 x 10 ¹	4,30 x 10 ¹	7,00 x 10 ¹	60
60°C				
Cuivre	≤ 10	≤ 10	≤ 10	
Polybutène	≤ 10	≤ 10	≤ 10	
C-PVC	≤ 10	≤ 10	≤ 10	

Croissance dans les biofilms

A 20° C, les surfaces du polybutène et du C-PVC sont colonisées par des quantités importantes de bactéries non-*Legionella* avec respectivement des valeurs moyennes de $5,70 \times 10^5$ et $1,81 \times 10^6$ UFC/cm² (tableau 2-14). Le cuivre est beaucoup moins colonisé que les surfaces plastiques, avec une valeur moyenne de $2,16 \times 10^5$ UFC/cm², significativement différente de celle des autres matériaux testés (limite de confiance 95 %).

Legionella pneumophila est présente dans les biofilms du polybutène et du C-PVC à des proportions moindres que celles de la flore totale, avec des valeurs moyennes respectivement de $6,65 \times 10^2$ et $2,13 \times 10^3$ UFC/cm² (tableau 2-15). Aucune *Legionella* n'a été détectée dans aucun des biofilms présents sur le cuivre (limite de détection de 10 UFC/cm²). La présence d'ions cuivre inhibe le développement des *Legionella* sur la surface de verre témoin.

biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model

Les populations de micro-organismes présentes sur le C-PVC sont similaires en diversité à celles présentes sur le polybutène. Le biofilm contient un mélange de bactéries Gram négatif, d'actinomycètes, de champignons et de protozoaires, y compris les amibes. Les *Pseudomonas* sont les principaux représentants microbiens et composent 72 % de la flore totale bactérienne, les plus abondants étant *P. testosteroni* et *P. paucimobilis*, mais *P. maltophilia*, *P. mendocina* et *P. stutzeri* sont aussi présents. Les actinomycètes représentent 24 % de la flore totale du biofilm et *Acinetobacter sp.* est en petite quantité. La diversité des micro-organismes présents à la surface du cuivre est significativement réduite en comparaison à celle du polybutène, avec seulement quatre espèces de *Pseudomonas* et deux autres genres bactériens. *Pseudomonas paucimobilis* est l'espèce la plus représentée, avec la présence également de *P. mendocina*, *P. testosteroni* et *P. xylosoxidans*. Plusieurs espèces d'amibes et d'autres protozoaires sont identifiés dans le pilote expérimental. Les amibes présentes comprennent *Verillefera bacillipedes*, *Hartmannella cantabrigiensis* et *Hartmannella vermiformis*, qui est capable d'assurer la croissance de *Legionella pneumophila*. D'autres protozoaires sont aussi présents, comprenant les stades mobiles et au repos de *Rotari neptuniaet* l'espèce prédatrice *Lacrymaria spp.* Bien que les protozoaires sont détectables dans la culture et à la surface du verre en présence de cuivre, aucun n'est apparu à la surface du coupon de cuivre sur les 21 jours de l'expérimentation.

A 40° C, le polybutène montre des niveaux de colonisation significativement plus élevés que le C-PVC et le cuivre, avec une valeur moyenne de $1,18 \times 10^6$ UFC/cm² (tableau 2-14). Le C-PVC présente des nombres élevés de bactéries non-*Legionella* avec une valeur moyenne de $3,67 \times 10^5$ UFC/cm². Le cuivre est le moins colonisé des matériaux testés avec une valeur maximale de $5,05 \times 10^4$ UFC/cm², ce qui est significativement plus bas que pour les autres matériaux plastiques. *Legionella pneumophila* est rapidement incluse

dans les biofilms des matériaux plastiques (tableau 2-15). Jusqu'à 48 % de la population présente sur le polybutène correspond à *L. pneumophila*, avec une valeur moyenne de $1,59 \times 10^4$ UFC/cm². La surface du C-PVC comprend une valeur moyenne en *L. pneumophila* de $4,64 \times 10^3$ UFC/cm², représentant un maximum de 35 % de la flore totale. Les biofilms des surfaces du cuivre sont capables de supporter la croissance de *L. pneumophila* après 24 heures, mais les nombres de cette bactérie sont significativement plus faibles que ceux des autres matériaux testés. La présence d'ions cuivre inhibe le développement des *Legionella* sur la surface de verre témoin, avec un pourcentage inférieur à 3 % de la population.

Les micro-organismes présents à la surface du polybutène comprennent 62 % de *Pseudomonas* et 38 % d'autres bactéries à Gram négatif. Les *Pseudomonas* sont dominés par *P. testosteroni* et *P. xylosoxidans*, avec d'autres espèces incluant *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. paucimobilis* et *P. vesicularis*. *Alcaligenes sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Acinetobacter sp.* et une autre bactérie à Gram négative, qui n'a pas pu se développer après subculture, sont aussi présents. La population à la surface du cuivre est initialement dominée par *P. paucimobilis* avec d'autres micro-organismes en plus petits nombres. La diversité des micro-organismes colonisant le cuivre est moindre que pour les autres matériaux, avec *Legionella pneumophila* ($2,00 \times 10^2$ UFC/cm²), *Methylobacterium sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Aspergillus sp.* et actinomycètes, étant les seules bactéries présentes.

Les amibes et autres protozoaires, présents à 20° C, ne sont pas détectables à 40° C.

A 50° C, les deux surfaces des matériaux plastiques présentent des nombres élevés de bactéries, mais le C-PVC est beaucoup moins colonisé, de manière significative, que le polybutène. La valeur moyenne de colonisation pour le polybutène est de $3,21 \times 10^6$ UFC/cm², alors qu'elle est de $1,22 \times 10^5$ UFC/cm². Le cuivre présente un biofilm peu abondant avec

Influence of temperature and plumbing material selection on potable water system containing complex microbial flora

une valeur moyenne de seulement $2,26 \times 10^4$ UFC/cm², ce qui est significativement plus faible que pour le polybutène et le C-PVC. Les surfaces de verre témoin incubé en présence des matériaux plastiques présentent aussi des nombres élevés de bactéries.

La colonisation des surfaces de verre témoin incubées en présence du cuivre est plus faible que pour celles incubées avec les matériaux plastiques.

De faibles nombres de *Legionella pneumophila* sont présents dans les biofilms des surfaces des matériaux plastiques et leur verre témoin représente moins de 0,1 % de la flore du biofilm. Aucune *Legionella pneumophila* n'est détectée sur les surfaces du cuivre pendant toute la durée de l'expérimentation.

L. pneumophila est détectée une seule fois dans les biofilms des surfaces du verre témoin incubé avec le cuivre, et à la limite de détection.

La diversité de la population microbienne sur le polybutène est grandement réduite à 50° C, les seuls représentants étant des *Pseudomonas* : *P. aeruginosa*, *P. paucimobilis* et le prédominant *Pseudomonas hydrogenophaga*. *Methylobacterium sp.* est l'espèce bactérienne prédominante sur le cuivre, représentant 62 % de la flore totale du biofilm, avec également *P. hydrogenophaga* et *P. paucimobilis*. Aucun protozoaire thermotolérant n'a été détecté dans le pilote expérimental à cette température de 50° C.

A 60° C, le polybutène est la surface la plus colonisée, avec une valeur moyenne en flore totale de $4,25 \times 10^4$ UFC/cm². Le C-PVC est moins colonisé avec une valeur moyenne de $5,19 \times 10^3$ UFC/cm².

Le cuivre est le moins colonisé de tous les matériaux testés, de manière significative, avec une valeur moyenne de $6,29 \times 10^2$ UFC/cm². Les surfaces de verre, incubé en présence des matériaux plastiques, ont une colonisation en flore totale de $1,25 \times 10^4$ (polybutène) et $1,78 \times 10^4$ (C-PVC) UFC/cm² ; en présence du cuivre, la colonisation est réduite à $6,29 \times 10^2$ UFC/cm². *L. pneumophila* n'est pas détectée dans le pilote expérimental à 60° C.

Le biofilm développé sur le polybutène est dominé par *Pseudomonas hydrogenophaga* et *Aspergillus fumigata*. Il y a beaucoup d'autres espèces transitoirement présentes, incluant *P. paucimobilis*, *Flavobacterium sp.* et *Methylobacterium sp.*, mais leurs petits nombres et leurs occurrences erratiques indiquent qu'ils sont plutôt des survivants du premier récipient que des membres actifs de la communauté microbienne. Les biofilms peu abondants sur le cuivre sont principalement composés de *Pseudomonas hydrogenophaga*, avec *P. paucimobilis* et *Methylobacterium sp.* présents aussi à 24 h.

Croissance dans la phase planctonique

A 20° C, la phase planctonique contient $1,3 \times 10^4$ à $7,56 \times 10^5$ UFC/ml de bactéries non-*Legionella*, en fonction des matériaux en contact. Leurs nombres sont moindres lorsque le cuivre est présent dans le pilote expérimental (tableau 2-14). La présence de cuivre réduit aussi les nombres de *L. pneumophila* sous la limite de détection. (tableau 2-15).

Lorsque les matériaux plastiques sont présents, *L. pneumophila* représente une faible proportion de la flore planctonique, environ 0,1 %.

A 40° C, les populations planctoniques des bactéries, autres que *Legionella*, varient de $1,42 \times 10^4$ à $3,90 \times 10^5$ UFC/ml, selon la composition des matériaux présents. *L. pneumophila* se trouve dans la phase planctonique à une concentration comprise entre $2,99 \times 10^2$ et $7,50 \times 10^3$ UFC/ml et représente jusqu'à 12 % de la population microbienne. Encore une fois, la présence de cuivre dans la phase aqueuse réduit à la fois la population totale et les nombres de *L. pneumophila*.

A 50° C, la population totale des bactéries non-*Legionella* est comprise entre $2,00 \times 10^4$ et $3,35 \times 10^6$ UFC/ml. *L. pneumophila* représente moins de 0,7 % de la population totale, avec des valeurs moyennes comprises entre $1,00 \times 10^1$ et $3,45 \times 10^2$ UFC/ml. Le cuivre réduit à la fois la population totale planctonique et les nombres de *L. pneumophila*.

biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model

A 60° C, *L. pneumophila* est absente dans la phase planctonique. Les nombres de bactéries de la phase planctonique sont faibles à cette température, entre $8,39 \times 10^2$ et $3,45 \times 10^4$ UFC/ml, avec des nombres encore plus faibles en présence de cuivre.

Présence de cuivre dans la phase aqueuse et dans les biofilms

Les échantillons prélevés dans la phase aqueuse du pilote expérimental montrent des concentrations négligeables de cuivre, les niveaux étant en dessous de la limite de détection tout au long de l'expérimentation (> 1 ppm).

Le biofilm développé sur la surface du verre témoin renferme $23,75 \mu\text{g}$ de cuivre total par cm^2 . Ceci suggère que, bien que la phase planctonique montre des niveaux indétectables d'ions cuivre, le cuivre est libéré de la surface du coupon de cuivre et s'accumule dans le biofilm présent à la surface du coupon de verre témoin.

Microcopie du biofilm

Durant la colonisation initiale du polybutène à 20° C, les bactéries forment des microcolonies qui sont isolées à la surface du matériau. Ces zones deviennent de plus en plus denses et au bout de 21 jours, les bactéries sont enchâssées dans un polymère extracellulaire et recouvrent toute la surface du matériau. Un même modèle de colonisation est constaté à 40° C, avec de petites régions, mais colonisées densément, déjà observées après seulement 24 h d'immersion dans la culture bactérienne.

Après 24 h à 50° C, les matériaux plastiques présentent une couche de biofilm bactérien dispersée sur toute la surface en petites microcolonies. Ces bactéries forment des biofilms de plus en plus denses au cours de l'essai. A 60° C, le dépôt de carbonate de calcium empêche la visualisation du biofilm bactérien.

L'observation de micro-organismes sur le cuivre est difficile en raison de la nature cristalline de la surface ; toutefois, des empreintes de bactéries peuvent être observées sur les biofilms de cuivre à 40° C.

Legionella pneumophila est capable de survivre et croître, à la fois dans les phases planctonique et biofilm, sur une large gamme de températures. A 20° C, la bactérie est en faible quantité, correspondant à un faible taux métabolique ; à 40° C, elle est la plus abondante dans le pilote expérimental, amplifiée par le consortium bactérien et coïncidant avec la diminution de ses hôtes potentiels, les protozoaires ; à 60° C, elle est absente dans le pilote.

Le cuivre est le moins "encrassé" biologiquement que pour les autres polybutène et C-PVC à toutes les températures examinées. Les nombres de *Legionella pneumophila* sont plus faibles à la surface du cuivre et la diversité microbienne moindre, les ions cuivre ayant un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. L'utilisation de tubes en cuivre prévient la colonisation mais peut aussi, par la libération d'ions cuivre, inhiber la colonisation de composants ne contenant pas de cuivre.

La viabilité des *Legionella pneumophila* est maintenue sur de longues périodes, indiquant que le biofilm les protège des hautes températures. Ceci suggère que les systèmes d'eau chaude opérant à 50° C peuvent contenir un réservoir de bactéries viables dans les biofilms ; la baisse de la température à 40° C conduit à une croissance rapide après une courte période, entraînant un risque accru d'infection.

Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth

➤ Influence des matériaux de canalisations sur la formation de biofilm et la croissance de *Legionella pneumophila* dans des réseaux d'eau potable
Rogers J. et al. - 1994

Le même pilote expérimental (pilote "biofilm" à deux étages), décrit précédemment, est utilisé pour étudier les influences possibles de 8 matériaux de canalisations sur le développement de biofilm et la croissance de *L. pneumophila*. Le pilote a été conçu pour étudier la croissance microbienne dans des conditions réalistes, simulant celles rencontrées dans les réseaux d'eau potable.

Les résultats

Les dénombrements de micro-organismes présents dans le biofilm et la phase planctonique sont présentés sur le tableau 2-16.

Les micro-organismes planctoniques

La flore planctonique du pilote expérimental contient une flore microbienne totale de 10^4 à 10^6 UFC/ml, avec des nombres de *Legionella pneumophila* compris entre 10^3 et 10^4 UFC/ml dans la plupart des essais (tableau 2-16). Une exception est observée après inclusion du latex et de l'éthylène-propylène

TABLEAU 2-16 : comparaison des nombres de micro-organismes dans les phases biofilm et planctonique du pilote expérimental

Valeurs moyennes des numérations des micro-organismes

Organismes	Matériau	Biofilm (UFC/cm ²)	phase planctonique (UFC/ml)	ratio biofilm/planctonique
Flore totale	Acier inoxydable	$2,13 \times 10^5$	$3,79 \times 10^5$	0.96
	Polypropylène	$4,54 \times 10^5$	$2,87 \times 10^5$	1.01
	C-PVC	$5,14 \times 10^5$	$2,63 \times 10^5$	0.83
	PVC-U	$6,23 \times 10^5$	$9,18 \times 10^4$	10.35
	Acier doux	$1,69 \times 10^6$	$4,30 \times 10^5$	7.58
	Polyéthylène	$2,75 \times 10^6$	$3,68 \times 10^6$	1.70
	Ethylène - propylène	$1,08 \times 10^7$	$2,40 \times 10^5$	14.47
	Latex	$5,50 \times 10^7$	$8,43 \times 10^6$	29.4
Legionellae	Acier inoxydable	$1,03 \times 10^4$	$5,30 \times 10^3$	1.94
	Polypropylène	$2,10 \times 10^4$	$3,42 \times 10^3$	6.14
	C-PVC	$2,24 \times 10^4$	$1,23 \times 10^3$	18.21
	PVC-U	$7,75 \times 10^3$	$1,06 \times 10^3$	7.31
	Acier doux	$2,06 \times 10^4$	$5,30 \times 10^4$	3.89
	Polyéthylène	$6,76 \times 10^3$	$6,68 \times 10^4$	1.01
	Ethylène - propylène	$1,44 \times 10^5$	$1,80 \times 10^4$	80
	Latex	$2,20 \times 10^5$	$1,38 \times 10^4$	12.2

of *Legionella pneumophila* in potable water systems

dans la culture. Un léger accroissement du nombre total de micro-organismes est observé dans certains cas, avec des réductions concomitantes des nombres de *Legionella pneumophila*. La diversité microbienne dans la phase planctonique est maintenue durant les essais, avec le maintien de tous les micro-organismes initialement présents.

Encrassement biologique des matériaux de canalisations

Tous les matériaux sont rapidement colonisés par des micro-organismes après insertion dans le pilote expérimental ; la concentration microbienne la plus faible est de $5,24 \times 10^4$ UFC/cm² sur l'acier inoxydable après seulement 24 heures. Les surfaces des élastomères (latex et éthylène-propylène) sont le plus rapidement encrassées et présentent une population microbienne supérieure à $1,0 \times 10^7$ UFC/cm² après la même période. L'acier inoxydable et les matériaux plastiques portent des biofilms qui contiennent 10^5 à 10^6 UFC/cm² après 24 heures.

Le latex et l'éthylène-propylène restent les plus fortement colonisés tout au long de l'expérimentation, avec respectivement des nombres maximaux de $8,9 \times 10^7$ et $2,9 \times 10^7$ UFC/cm² (tableau 2-17). Ils sont significativement plus colonisés que les autres matériaux testés (limite de confiance 95 %). L'acier inoxydable porte le plus petit nombre de micro-organismes dans les biofilms, en comparaison des autres matériaux, avec une valeur maximale de flore récupérée à $6,45 \times 10^5$ UFC/cm². À l'inverse, l'acier doux (qui a présenté une corrosion) porte un biofilm qui contient jusqu'à $4,95 \times 10^6$ UFC/cm².

Parmi les matériaux plastiques, le polyéthylène apparaît comme le plus fortement colonisé, avec une microflore récupérée de $1,3 \times 10^7$ UFC/cm² après 4 jours dans le pilote expérimental. Les nombres totaux de micro-organismes présents sur la surface des autres matériaux plastiques restent compris entre 10^5 et 10^6 UFC/cm² pendant la durée de l'expérimentation, avec, selon un ordre croissant de colonisation, le polypropylène, le C-PVC et le PVC-U.

Durant l'expérimentation, les surfaces des élastomères portent des nombres de micro-organismes plus élevés que ceux des surfaces du verre témoin. La surface du verre présente moins de 1,4 % des micro-organismes associés à la surface du latex et moins de 7,1 % des micro-organismes associés à la surface de l'éthylène-propylène. Les surfaces du polypropylène et du C-PVC présentent des nombres de micro-organismes plus élevés que ceux des surfaces du verre. Bien que la colonisation initiale du polyéthylène et du PVC-U soit plus rapide que celle de la surface du verre témoin, elle ne se maintient pas et il n'y a pas de différence significative entre les niveaux de colonisation de ces matériaux et du verre pour les 27 jours suivants.

Toutes les surfaces des matériaux (à l'exception du polyéthylène et du PVC-U) portent des flores totales significativement plus élevées que celles du verre témoin (limite de confiance 95 %).

Inclusion de *Legionella pneumophila* dans les biofilms

L. pneumophila est trouvée dans les biofilms de tous les matériaux après seulement 24 heures d'exposition à l'eau renfermant la bactérie. Les nombres UFC de *L. pneumophila* incluses dans les biofilms ne sont pas corrélés avec le nombre total de micro-organismes présents (tableau 2-16). Les biofilms des élastomères contiennent les plus grands nombres de *L. pneumophila* pour l'ensemble de l'expérimentation, avec plus de 2×10^6 UFC/cm². Toutefois, *L. pneumophila* ne représente seulement qu'un maximum de 3,5 % de la communauté bactérienne totale sur les surfaces des élastomères. Inversement, plusieurs matériaux ont une proportion plus élevée de *L. pneumophila* dans le biofilm, et notamment, de grandes quantités de cette bactérie apparaissent dans le biofilm du C-PVC après 7 jours.

Les nombres UFC de *L. pneumophila* varient dans les biofilms développés sur les surfaces des matériaux plastiques. Le polypropylène porte un biofilm contenant jusqu'à $6,6 \times 10^4$ UFC/cm²,

Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth

ce qui représente 10,3 % de la flore totale du biofilm. Le polyéthylène contient des UFC de *L. pneumophila* moins nombreuses, avec un maximum de $2,3 \times 10^4$ UFC/cm², ce qui représente 4 % de la flore totale du biofilm. Le PVC-U porte un biofilm avec un maximum de $1,0 \times 10^4$ UFC/cm² en *L. pneumophila*, ce qui représente seulement 1 % des micro-organismes. À l'inverse, le biofilm du C-PVC contient $7,8 \times 10^4$ UFC/cm² en *L. pneumophila*, qui représentent 15 % de la flore totale du biofilm. Les biofilms des métaux contiennent une forte proportion de *L. pneumophila*, qui représente 11 % de la population sur l'acier inoxydable et 31 % de la population sur l'acier doux.

Les biofilms qui se développent sur les matériaux contiennent beaucoup plus de *L. pneumophila* que ceux des surfaces du verre témoin. Sans exception, les matériaux testés ont des nombres de *L. pneumophila* dans leurs biofilms significativement plus élevés que pour le verre (limite de confiance 95 %). Les surfaces de verre contiennent moins de la moitié du nombre de *L. pneumophila* apparaissant sur les surfaces des matériaux.

Comparaison des niveaux de colonisation de différents matériaux avec le verre

Lorsque les valeurs moyennes sont comparées, tous les matériaux ont des niveaux de colonisation totale plus élevée et des nombres plus importants de *L. pneumophila* que le verre (immersion dans le pilote expérimental sans aucun autre matériau) (tableau 2-17). Les élastomères portent les plus grands nombres de la flore totale et de *L. pneumophila*, mais l'augmentation de l'encrassement total des matériaux est plus grande que l'augmentation du nombre de *L. pneumophila*. Les matériaux plastiques ont des augmentations des flores du biofilm de 2,4 à 14,5 fois par rapport au verre. De manière identique aux données précédentes de la flore planctonique, les nombres de *L. pneumophila* dans les biofilms des matériaux plastiques ne sont directement reliés à l'augmentation de la flore totale ; par exemple, le C-PVC a une augmentation de 3 fois de la flore

totale par rapport au verre, mais une augmentation différente de *L. pneumophila*, qui est 13 fois plus importante. L'acier inoxydable est le moins colonisé des matériaux, mais l'augmentation des nombres de *L. pneumophila* dans le biofilm dépasse ceux du PVC-U et du polyéthylène malgré le fait qu'ils portent des flores totales plus élevées.

Les nombres de *L. pneumophila* sur l'acier doux sont plus élevés que ceux sur l'acier inoxydable, ce qui peut être due à la disponibilité accrue du fer en relation avec la corrosion de l'acier doux. Le fer est un nutriment essentiel de croissance et sa disponibilité est habituellement limitée dans les systèmes aquatiques.

Composition des flores du biofilm et planctonique

Les valeurs moyennes des flores totales du biofilm et les nombres moyens de *L. pneumophila* dans les phases planctoniques sont comparés (tableau 2-16). Dans la plupart des cas, le biofilm contient de plus grands nombres par unité de surface que dans la phase planctonique par unité de volume. Les ratios biofilm/phase planctonique les plus élevés sont retrouvés en présence de PVC-U, acier doux, éthylène-propylène et latex. Inversement, les plus grands ratios biofilm/phase planctonique associés à *L. pneumophila* apparaissent en présence de polypropylène, C-PVC, PVC-U, éthylène-propylène et latex.

Ces données suggèrent que *L. pneumophila* peut souvent être détectée en nombres plus élevés dans le biofilm que dans la phase planctonique, bien que ceci varie selon le temps et le matériau testé. L'analyse de la qualité de l'eau dans les systèmes aquatiques ne comprend souvent que le prélèvement d'eau, en partie à cause de la facilité d'accès et d'étude. Toutefois, une analyse plus précise pourrait être possible si les biofilms étaient aussi prélevés, particulièrement dans des systèmes avec de grands ratios surface/volume (par exemple, les tous aëroréfrigérantes).

TABLEAU 2-17 : comparaison des matériaux sur leur aptitude à développer un biofilm et à la colonisation par *Legionella pneumophila*

Matériau	Colonisation (moyenne UFC/cm ²)		Ratio de colonisation*	
	Flore totale	<i>L. pneumophila</i>	Flore totale	<i>L. pneumophila</i>
Verre	1,90 x 10 ⁵	1,70 x 10 ³	1	1
Acier inoxydable	2,13 x 10 ⁵	1,03 x 10 ⁴	1.1	6.1
Polypropylène	4,54 x 10 ⁵	2,10 x 10 ⁴	2.4	12.4
C-PVC	5,14 x 10 ⁵	2,24 x 10 ⁴	2.7	13.1
PVC-U	6,23 x 10 ⁵	7,75 x 10 ³	3.3	4.6
Acier doux	1,69 x 10 ⁶	2,06 x 10 ⁴	8.9	12.1
Polyéthylène	2,75 x 10 ⁶	6,76 x 10 ³	14.5	4.0
Ethylène - propylène	1,08 x 10 ⁷	1,44 x 10 ⁵	56.8	84.7
Latex	5,50 x 10 ⁷	2,20 x 10 ⁵	289	129

* le ratio de colonisation est le nombre d'UFC/cm² de la flore totale ou des *Legionellae* trouvé pour chaque matériau comparé à celui du verre

Micro-organismes présents sur les matériaux après 24 heures

Les micro-organismes qui colonisent les surfaces des matériaux varient dans leur composition en espèces. Après 24 h, la communauté microbienne sur l'acier doux est dominée par les *Pseudomonas* qui représentent 52 % de la flore ; les principales espèces sont *P. testosteroni* et *P. paucimobilis*. D'autres micro-organismes apparaissent en grand nombre sur ce matériau comprenant *Methylobacterium*, *Acinetobacter* et *Klebsiella spp.* Sur l'acier inoxydable, les *Pseudomonas* représentent 61 % des espèces présentes après 24 h, avec la présence de *P. paucimobilis*,

P. testosteroni, *P. stutzeri* et *P. vesicularis*. Le seul micro-organisme le plus abondant est un *Acinetobacter sp.* ($2,6 \times 10^4$ UFC/cm²).

Une diversité de *Pseudomonas* est présente sur le C-PVC après 24 h, comprenant *P. acidovorans*, *P. mendocina*, *P. paucimobilis*, *P. stutzeri* et *P. xylesoxydans*. Des actinomycètes sont aussi présents. La colonisation initiale du polyéthylène montre aussi en prédominance des *Pseudomonas*. Les principales espèces sont *P. fluorescens*, *P. acidovorans* et un *Acinetobacter sp.* Au contraire, les *Pseudomonas* et d'autres bactéries Gram négatif apparaissent en proportions égales dans le biofilm

Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth

formé sur le polypropylène. Les micro-organismes les plus abondants sont *P. diminuta* et un *Acinetobacter sp.*, avec la présence de *P. fluorescens*, *P. mendocina*, un *Alcaligenes sp.*, un *Flavobacterium sp.*, un *Methylobacterium sp.*, et des actinomycètes représentant une petite proportion de la flore du biofilm. Sur le PVC-U, les biofilms sont composés d'un mélange de bactéries à Gram négatif (principalement *P. acidovorans* et *P. vesicularis*) et d'actinomycètes.

La surface du latex est initialement colonisée par une flore mixte, comprenant *P. xyloxydans*, un *Acinetobacter sp.* et des actinomycètes. Sur l'éthylène-propylène, la communauté microbienne est initialement dominée par *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, et *Alcaligenes spp.* Environ 15 % du biofilm est composé de *Pseudomonas*, avec *P. diminuta* et *P. maltophilia* en nombres équivalents.

Communautés de micro-organismes présents après 21 jours sur les matériaux

Les *Pseudomonas* continuent de dominer dans les biofilms développés sur l'acier doux, représentant 62 % de la flore totale. Toutefois, *Pseudomonas aeruginosa* et *P. vesicularis* remplacent *P. mendocina*, *P. testosteroni* et *Klebsiella spp.* qui étaient précédemment sur la surface. Une proportion similaire de *Pseudomonas* est présente sur la surface de l'acier inoxydable, où un *Aspergillus sp.* et un *Alcaligenes sp.* remplacent un *Flavobacterium sp.* et un *P. mendocina*.

La diversité des micro-organismes dans le biofilm du latex est accrue par l'ajout d'un *P. paucimobilis* et d'un *P. stutzeri* sur la surface ; toutefois, les *Pseudomonas* ne représentent que 11 % de la flore. Une aussi faible proportion de *Pseudomonas* dans

la flore est observée sur l'éthylène-propylène, et le biofilm mature comprend de grands nombres d'*Aspergillus sp.* et d'actinomycètes. À l'inverse, les *Pseudomonas* composent entre 37 et 49 % les communautés du biofilm sur les matériaux plastiques.

Microscopie des biofilms

Le latex et l'éthylène-propylène sont complètement recouverts d'une fine couche de biofilm après seulement 24 h d'immersion dans la culture. Le biofilm peut être observé sans agrandissement et varie en épaisseur sur la surface mais présente une épaisseur d'au moins 200 µm. Le biofilm est composé d'une variété de micro-organismes comprenant des bactéries de diverses morphologies et d'amibes, qui sont engluées dans une matrice extracellulaire. Des craquelures, liées à la préparation, apparaissent dans le biofilm et le substrat peut être observé sous le biofilm dans quelques zones.

De manière comparable aux résultats de récupération des micro-organismes, les biofilms sur les surfaces des matériaux plastiques se forment moins rapidement que ceux sur les élastomères. Les micro-organismes présents sur les matériaux plastiques apparaissent initialement sous forme de micro-colonies sur la surface, qui se développent ensuite en zones plus denses de biofilm, particulièrement dans les crevasses de la surface. À la maturation des biofilms, les espaces entre les micro-colonies se réduisent et au 28^{ème} jour, la plupart des surfaces des matériaux plastiques sont recouvertes de biofilm ; toutefois, des canaux (où l'eau et les nutriments peuvent circuler) sont encore mis en évidence par la procédure de microscopie utilisée. Des amibes et protozoaires altérés peuvent être observés dans certains échantillons.

L'acier doux est fortement corrodé après 24 h d'immersion dans la culture, et quelques micro-

of *Legionella pneumophila* in potable water systems

organismes sont observés dans les produits de corrosion. L'accumulation de débris à la surface de l'acier inoxydable rend aussi l'observation difficile, mais une croissance microbienne associée peut être discernée.

Amibes et autres protozoaires dans les biofilms

Les organismes au repos et mobiles, présents dans les biofilms, sont identifiés à Rotari neptunia. D'autres protozoaires incluant le prédateur Lacrymaria spp. sont connus pour ingérer les amibes. Les amibes isolées des cultures comprennent Hartmannella vermiformis, Hartmannella cantabrigiensis, et Verillifera bacillipedes.

Libération de nutriments par les surfaces des matériaux

L'incubation des matériaux dans l'eau produit des niveaux élevés en carbone organique total (COT) par tous les matériaux. Les surface du latex, éthylène-propylène et polyéthylène augmentent les concentrations de COT à plus de 150 mg/l. Le cuivre et les autres matériaux plastiques augmentent faiblement la quantité de COT dans l'eau.

Les matériaux testés dans cette étude favorisent tous le développement de biofilm, et tous contiennent *Legionella pneumophila*. Toutefois, les biofilms diffèrent en diversité, abondance et morphologie, et sont influencés par le matériau support. Les matériaux des canalisations peuvent indirectement causer une augmentation de *Legionella pneumophila* dans l'environnement aquatique en favorisant la croissance du biofilm sur la surface.

Les biofilms les plus développés sont observés avec les élastomères, qui libèrent des nutriments de croissance microbienne. Les matériaux plastiques sont capables d'apporter des nutriments mais la colonisation microbienne des surfaces est surtout favorisée par l'état de surface des matériaux.

Les données présentées dans cette étude démontrent que les nombres de *Legionella pneumophila* ne peuvent être prédites à partir des nombres totaux de bactéries présentes dans le biofilm. Il serait néanmoins préférable d'utiliser des matériaux qui ne favorisent pas le développement de biofilm qui pourrait ensuite aider à la croissance de *Legionella pneumophila*.

Les micro-organismes, qui se multiplient dans les réseaux intérieurs de distribution d'eau, posent des problèmes de qualité d'eau et/ou d'impact sanitaire. Les micro-organismes les plus fréquemment observés sont présentés ci-dessous.

3.1 *Legionelle pneumophila*

En 1976, 182 personnes logeant dans un hôtel de Philadelphie sont atteintes d'une infection respiratoire provoquant 34 décès. La plupart des malades participaient à la 56^{ème} convention de l'American Legion, d'où les noms de "maladie du légionnaire" donné à cette pneumopathie (aujourd'hui *legionellose*) et de "*Legionella*" à la nouvelle bactérie identifiée.

Les bactéries du genre *Legionella* sont des bacilles à Gram négatif aérobies, qui mesurent de 0,2 à 0,9 µm de large sur 2 à 20 µm de long. Elles ne sont ni capsulées, ni sporulées, et peuvent être mobiles grâce à un ou deux flagelles polaires. Elles appartiennent à la famille des *Legionellaceae*. Une soixantaine d'espèces de *Legionella* ont été identifiées, mais la plus fréquemment isolée en pathologie humaine est *Legionella pneumophila*. Ces espèces sont divisées en 70 sérogroupes et *Legionella pneumophila* en comprend 16. Le séro groupe 1 de *Legionella pneumophila* est aussi divisé en sous-types, selon les propriétés immunologiques et génomiques, par exemple, Pontiac, Philadelphie, Bellingham, Paris, Lens,...

Les *Legionella* sont caractérisées par une croissance relativement lente et ont besoin pour se multiplier d'un acide aminé, la L-cystéine et de fer (Fe²⁺ ou Fe³⁺). Dans les milieux hydriques, leur survie et leur croissance sont influencées par de nombreux paramètres :

- la température : croissance optimale à 35° C, multiplication entre 20 et 45° C ; survie entre 6 et 66° C ;
- le pH : tolérance d'une large gamme de pH entre 5,5 et 10 ;
- les concentrations en ions fer et zinc ;
- les conditions hydrauliques, notamment la stagnation de l'eau ;
- la présence d'autres micro-organismes : protozoaires, cyanobactéries, biofilms.

Chez l'homme, la contamination s'effectue par l'inhalation d'un aérosol composé de fines gout-

telettes d'eau contaminée. L'infectiosité d'un aérosol est liée à différents paramètres : ses caractéristiques physiques, dont la taille des gouttelettes, sa concentration en *Legionella* et leur capacité de survie dans l'aérosol. Un aérosol ne peut être infectieux que si les gouttelettes d'eau qui le composent sont suffisamment fines pour atteindre les alvéoles pulmonaires (diamètre inférieur ou égal à 5 µm) (Bollin *et al.* 1985 ; Girod *et al.* 1982) et assez grandes pour contenir une ou plusieurs cellules bactériennes (diamètre supérieur à 2 µm) (Baron and Willeke, 1986).

Après avoir pénétré dans l'arbre pulmonaire, *Legionella pneumophila* établit un foyer infectieux au sein de l'alvéole pulmonaire où la bactérie interagit avec les macrophages et les cellules épithéliales (Mody *et al.* 1993). Sur les modèles expérimentaux animaux, un important accroissement de l'inoculum bactérien est observé dans le cul-de-sac alvéolaire, jusqu'à la 48^{ème} - 78^{ème} heure après l'inoculation. Après multiplication des *Legionella pneumophila*, la cellule infectée est lysée, entraînant d'importantes lésions au niveau de la barrière alvéolo-capillaire, la diffusion à d'autres zones pulmonaires et la dissémination par voie hématogène de la bactérie à des compartiments extrapulmonaires (Ader *et al.* 2008 ; Brieland *et al.* 1997).

La dose infectante chez l'homme est inconnue. Seules sont connues les doses infectantes obtenues sur des modèles expérimentaux animaux (cobayes, souris consanguines et primates), après exposition à un aérosol contaminé ou par instillation intra-trachéale directe (Ader *et al.* 2008 ; Berendt *et al.* 1980 ; Breiman *et al.* 1990 ; Brieland *et al.* 1997). La dose nécessaire pour induire une infection *in situ* a pu être évalué :

- un inoculum de 10⁶ unités formant colonies provoque un syndrome pseudo-grippal (fièvre de Pontiac), avec une survie de 100 % des animaux exposés ;
- un inoculum de 10⁷ unités formant colonies provoque une infection, avec un taux de mortalité de 10 à 25 % (proche de celui observé chez l'homme) ;
- un inoculum supérieur ou égal à 10⁸ unités formant colonies est systématiquement léthal pour l'animal.

Ces observations ne prennent pas en compte certains paramètres tels que le taux de transfert bactérien air-alvéoles et les modifications anatomofonctionnelles induites par les pathologies bronchopulmonaires chroniques (tabagisme,...).

Il est admis que le développement et la gravité de la maladie sont conditionnés par le niveau

Association *Legionella* - autres micro-organismes

➤ La présence dans les milieux hydriques de protozoaires, de biofilms ou autres cyanobactéries peut influencer sur la survie, la protection, le développement et la dissémination de *Legionella* (Declerck, 2010).

a. association avec les protozoaires

Les eaux douces sont généralement colonisées par de nombreux protozoaires, parmi lesquels figurent au premier rang les amibes libres et les ciliés (Cavalier-Smith, 1993 ; Finlay and Esteban, 1998).

Les amibes libres sont des protozoaires de taille variant entre 10 μm et 1 mm de longueur (200 - 500 μm en moyenne). Elles vivent en milieu aqueux, dans lequel elles se déplacent le plus souvent par reptation à l'aide de pseudopodes, voire à l'aide de flagelles. Elles se reproduisent par division binaire et se nourrissent par phagocytose de microalgues, de protozoaires plus petits et de bactéries (Corsaro et al. 2010). Dans leur milieu naturel, les conditions affectant leur croissance sont le pH, la température, la salinité et la teneur en soufre (acide sulfurique) (Rodriguez-Zaragoza, 1994). Les amibes libres sont capables de se développer à des températures très variées, dans des plages spécifiques à chaque espèce (Griffin, 1972). La température moyenne de croissance pour le genre *Acanthamoeba* se situe entre 30 et 37° C, avec des variantes thermorésistantes susceptibles de croître à des températures plus élevées (De Jonckheere, 1980).

Les ciliés sont des protozoaires binucléés pouvant atteindre 2 mm de long et caractérisés par la présence constante ou provisoire de cils vibratiles à leur surface. Ils sont présents dans les eaux douces, saumâtres et marines où ils existent sous diverses formes : formes libres nageuses, formes fixes pédonculées, formes coloniales, formes parasitaires non pathogènes ou formes symbiotiques. Les ciliés sont hétérotrophes et se nourrissent de particules organiques, de bactéries, d'autres ciliés, de flagellés, voire d'animaux microscopiques (Baroin-Tourancheau et al. 1992 ; Lynn and Corliss, 1991).

La relation entre *Legionella* et protozoaires a été étudiée pour *Legionella pneumophila* avec des

amibes libres des genres *Naegleria* ou *Acanthamoeba* (Kuiper et al. 2004) ou des ciliés du genre *Tetrahymena* (Faulkner et al. 2008).

Ces protozoaires sont des hôtes naturels de *Legionella*, voire leur principal réservoir dans l'environnement (Fields et al. 2002) et constituent un microenvironnement propice à leur multiplication dans un milieu extérieur défavorable (par exemple, carence en nutriments, températures élevées, présence de désinfectant, etc.) (Holden et al. 1984 ; Rowbotham, 1983), les *Legionella* résistant à la digestion par l'amibe (Fields, 1996). Les amibes confèrent une protection aux *Legionella* qu'elles hébergent ; cette protection augmente encore dans l'amibe enkystée. L'implication des amibes dans le développement de nombreux micro-organismes pathogènes est désormais avérée (Pagnier et al. 2009).

Le maintien ou la croissance des *Legionella* dans les protozoaires et leur dissémination se produisent grâce aux vésicules digestives :

- chez les ciliés, il y a formation d'une "pelote", contenant des *Legionella* digérées et d'autres intactes, potentiellement infectieuses, qui est relarguée dans le milieu extérieur (Garduño et al. 2006) ;
- chez les amibes libres, la vésicule, où les *Legionella* se multiplient activement en perdant leur mobilité, envahit peu à peu le cytoplasme. Elle est susceptible de se rompre, entraînant la lyse de l'amibe et la libération de *Legionella* redevenues mobiles. Dans certains cas, l'amibe libère également des vésicules encore intactes, de diamètre compris entre 1 et 5 μm (Berk et al. 1998), qui seraient des vecteurs particulièrement efficaces d'infection par les *Legionella* (Philippe et al. 2006). Leur petite taille les rend aptes à être inhalées profondément dans l'arbre bronchique et la membrane amibienne qui les entoure est suspectée de favoriser leur fusion avec la membrane des cellules de l'épithélium pulmonaire (Berk et al. 1998). Par ailleurs, la survie de ces vésicules dans l'environnement peut être extrêmement longue (supérieure à plusieurs mois, ce qui en accentue la dangerosité (Bouyer et al. 2007).

La température joue un rôle important dans l'association amibes - *Legionella* : *Legionella pneumophila* infecte de manière optimale les

Association *Legionella* - autres micro-organismes

formes trophozoïtes d'*Acanthamoeba* à des températures supérieures à 25°C (Berk et al. 1998) tandis que c'est à 35°C que le relarguage des vésicules par les trophozoïtes est optimal (Fields et al. 2002). Une baisse de température (inférieure à 20°C) favorise le phénomène d'enkystement et de relarguage des vésicules ambiennes, non ou partiellement digérées, renfermant de nombreuses *Legionella* infectieuses (Ohno et al. 2008).

Les protozoaires constituent un réservoir de *Legionella* et contribuent à leur protection contre les stress environnementaux, notamment les traitements de désinfection, favorisent leur multiplication et leur revivification, et semblent accroître leur pathogénicité pour l'homme.

b. association avec le biofilm

Legionella pneumophila est capable de survivre dans les biofilms présents à l'intérieur de réseaux d'eau (Declerck, 2010, Moritz et al. 2010). La proportion de *Legionella pneumophila* cultivables, dans la phase biofilm et dans la phase planctonique, libre dans l'eau, dans une installation simulant une canalisation d'eau potable, varie avec la température (Rogers et al. 1994) :

- à 20° C, *Legionella pneumophila* représente une faible proportion (0,1 %) de la population bactérienne cultivable dans les deux phases ;

- à 40° C, *Legionella pneumophila* représente 12 % des bactéries de la phase planctonique et 50 % du biofilm ;
- à 50° C, *Legionella pneumophila* ne représente plus que 0,7 % des bactéries de la phase planctonique et 0,1 % du biofilm ;
- à 60° C, la bactérie est indétectable dans les deux phases.

Legionella pneumophila peut se multiplier dans les biofilms en présence de protozoaires comme l'amibe *Hartmanella vermiformis* (Moritz et al. 2010). Il est possible également que la bactérie puisse se multiplier grâce au complexe nutritif que représente le biofilm, en dehors d'une cellule de protozoaire hôte (Fields et al. 2002).

Le biofilm constitue un réservoir de *Legionella* et contribue à leur survie et leur protection contre les stress environnementaux, notamment les traitements de désinfection.

La présence et le développement de nombreux protozoaires dans le biofilm, le biofilm lui-même, pourraient contribuer à la persistance des *Legionella* et à la recontamination plus rapide des installations après un traitement de désinfection.

d'exposition. Plus l'aérosol véhicule un nombre important de *Legionella* viables, plus l'inoculum atteignant les voies aériennes inférieures serait important et plus l'impact serait important sur la morbi-mortalité.

Les conséquences médicales des expositions aux *Legionella* sont soit une infection non-pulmonaire de type grippal (Fièvre de Pontiac) dont l'issue est généralement favorable, soit une infection pulmonaire (légionellose).

La légionellose est une pneumopathie sévère. La période d'incubation étant de l'ordre de 2 à 10 jours, les symptômes de la légionellose

peuvent paraître dans les 2 à 10 jours après l'exposition aux légionelles. La létalité, bien que plus faible que par le passé, atteint 11 %. La guérison nécessite un traitement antibiotique précoce et spécifique (macrolides, fluoroquinolones) ; elle est obtenue souvent après plusieurs semaines voire plusieurs mois.

La légionellose est, depuis 1987, une maladie à déclaration obligatoire auprès des autorités sanitaires : près de 1 200 cas de légionellose sont notifiés chaque année en France, sous forme de cas isolés, plus rarement de cas groupés.

La légionellose concerne des personnes âgées, des personnes avec des facteurs de risque comme le tabagisme et des personnes fragilisées, notamment par une immunodépression, une transplantation, un diabète ou une insuffisance cardiaque. Elle concerne aussi un nombre important de personnes, notamment des jeunes adultes, sans facteur de risque identifié.

Le diagnostic de la légionellose s'appuie sur l'existence d'une pneumonie confirmée radiologiquement. Le diagnostic clinique est suivi d'un diagnostic biologique qui peut être réalisé selon différentes méthodes : isolement de la bactérie dans un prélèvement bronchique, présence d'antigènes solubles dans les urines, augmentation des titres d'anticorps par quatre entre deux prélèvements sanguins successifs.

3.2 *Pseudomonas aeruginosa* et autres *Pseudomonas*

Le groupe des *Pseudomonades* comprend des bacilles à Gram négatif, droits ou légèrement incurvés, de 0,5 à 1,0 µm de large sur 1,5 à 5,0 µm (ou plus) de long, non sporulés, ni capsulés. Ces bactéries sont très généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires.

Les *Pseudomonas* sont des bactéries aérobies, à métabolisme strictement respiratoire. La gamme de croissance est étendue puisque certains *Pseudomonas* peuvent être considérés comme psychrotrophes avec une température minimale de croissance voisine de 3° C ; d'autres comme thermophiles modérés avec une température maximum voisine de 45° C. Globalement, tous sont capables de se multiplier à 28° C et pour des valeurs de pH supérieures à 4,5. Leur caractéristique majeure reste la diversité et la pluralité des substrats carbonés qu'ils sont capables d'utiliser et leur richesse en enzymes hydrolytiques (protéases, lipases, estérases, etc.).

Dans leur grande majorité, les *Pseudomonas* produisent des sidérophores (pyocyanine, pyorubine, chlororaphine, oxyphénazine), macromolécules chélatrices des ions ferriques qui sont synthétisées en réponse à une carence en fer du milieu.

Legionella et légionellose

➤ En France, les données de l'Institut National de Veille Sanitaire (InVS) sur 11 147 cas confirmés de légionellose entre 1988 et 2008 montrent que 88 % des cas diagnostiqués, par l'ensemble des analyses (tests d'antigénurie, sérologie et culture), sont dus à *Legionella pneumophila* séro-groupe 1. Pour 18 % de l'ensemble des cas diagnostiqués par culture, les prélèvements des sécrétions respiratoires ont permis d'isoler *Legionella pneumophila* dans 98 % des cas et le séro-groupe 1 dans 93 % des cas (Campese et al. 2010).

En Europe, les données sur 10 715 cas déclarés de légionellose en 2007 et 2008 rapportés par 34 pays montrent que 79,6 % des cas étaient dus à *Legionella pneumophila* séro-groupe 1, 15 % à un autre séro-groupe de *Legionella pneumophila* et 5,4 % à une autre espèce de *Legionella*. Sur les 1 042 souches identifiées, 86,0 % étaient des *Legionella pneumophila* séro-groupe 1, 7,5 % des *Legionella pneumophila* séro-groupes 2-16 avec une prédominance du séro-groupe 3 (3,2 %) et du séro-groupe 6 (1,2 %), et 3,6 % étaient des *Legionella pneumophila* de séro-groupe non déterminé ou des *Legionella* non identifiées (Joseph et al. 2010).

Dans une étude internationale réalisée par Yu et al. (2002), sur 508 cas confirmés par culture, l'espèce *Legionella pneumophila* constituait 91,5 % des isolats et le séro-groupe 1 était responsable de 84,2 % des cas.

La prédominance de *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 en pathologie humaine ne semble pas liée à une prédominance environnementale, ce séro-groupe représentant moins de 30 % des *Legionella* identifiées dans l'environnement (Doleans et al. 2004). Elle pourrait être liée à une plus grande infectiosité de ce séro-groupe pour l'homme. Les lipopolysaccharides déterminant le séro-groupe 1, présents dans la paroi bactérienne, joueraient un rôle dans la haute prévalence de la légionellose humaine.

Une vingtaine d'espèces de *Legionella* autres que *pneumophila* ont été impliquées dans au moins un cas de légionellose, par exemple, *Legionella longbeachae*, *Legionella bozemanii*. Elles ont été surtout identifiées chez des individus souffrant d'une immunodépression préexistante sévère.

Prévalence de *Pseudomonas aeruginosa* dans les eaux de distribution publique

➤ La prévalence de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau distribuée au robinet en France a été évaluée à partir des données de la base SISE-Eaux (Système d'Information en Santé-Environnement sur les Eaux) du Ministère chargé de la santé. Cette base rassemble les données du contrôle sanitaire des eaux d'alimentation.

Entre 1996 et 2009, la prévalence de *Pseudomonas aeruginosa* dans les 2 085 échantillons de 100 ml analysés est de 3,2 %. La médiane des concentrations mesurées est de 8 UFC/100 ml et le 90^{ème} percentile est de 200 UFC/100 ml pour les échantillons positifs.

Pour les 541 échantillons de 250 ml, la prévalence est de 6,8 %, la médiane des concentrations mesurées est de 1,6 UFC/100 ml et le 90^{ème} percentile est de 32 UFC/100 ml.

Certaines de ces molécules sont souvent considérées comme caractéristiques d'espèces telle la pyocyanine, pigment vert-bleu de *Pseudomonas aeruginosa*.

Le genre *Pseudomonas* possède une extrême diversité phénotypique. Si plus de 150 espèces ont été différenciées grâce à l'apport des techniques de la phylogénétique moléculaire, les souches bactériennes ont un tel pouvoir adaptatif que chaque isolat peut être considéré comme une bactérie originale. Le remarquable potentiel génétique et physiologique adaptatif des *Pseudomonas* se traduit par des propriétés de résistance à de nombreux antibiotiques, à certains agents chimiques et physiques (biocides, sels de bore, de chrome et métaux lourds, rayonnements ultraviolets, etc.), aux bactériophages et à certaines bactériocines. Cette capacité d'adaptation est responsable de la distribution universelle des *Pseudomonas* dans les environnements naturels et artificiels (Spiers *et al.* 2000).

Les *Pseudomonas* sont capables de former des biofilms sur des matériaux tels que le polychlorure de vinyle (PVC) (Vess *et al.* 1993), le verre (Rao *et al.* 1997) ou l'acier inoxydable (Percival *et al.* 1998).

Après 5 mois de circulation d'eau dans un réseau pilote, les *Pseudomonas* représentent entre 56 et 93 % des genres identifiés dans les biofilms constitués sur les aciers 304 et 316. *Pseudomonas aeruginosa* survit plusieurs semaines dans le biofilm de canalisations en EPDM (éthylène propylène diène monomère) et en PE Xb (polyéthylène réticulé), mais non sur les canalisations en cuivre (Moritz *et al.* 2010).

Pseudomonas aeruginosa a des capacités à survivre en milieu oligotrophe, à se développer dans les biofilms et à résister à de nombreuses substances actives dont des biocides ; ce qui lui confère un fort potentiel de colonisation des surfaces humides. Il peut être présent dans des eaux résiduaires, des eaux de surface, des eaux destinées à la consommation humaine (eaux du réseau de distribution publique et eaux conditionnées), des eaux récréatives, des eaux de bain bouillonnant et de spa insuffisamment traitées, ou des eaux distillées (Mena *et Gerba*, 2009). Il peut être associé à la robinetterie et aux siphons, aux objets et linge de toilette, aux dispositifs médicaux contenant des liquides (par exemple, humidificateurs des respirateurs artificiels). Il peut également contaminer certains produits alimentaires tels que le lait cru ou le fromage (Gennari *et Dragotto*, 1992), les légumes dont les salades (Dejli *et al.* 2000 ; Soriano *et al.* 2000).

Pseudomonas aeruginosa constitue un marqueur de la qualité générale de l'entretien des réseaux de distribution d'eau et de sa contamination par des activités humaines.

Pseudomonas aeruginosa est l'espèce la plus fréquemment rencontrée chez l'homme en portage sain, au niveau du tractus digestif, des voies oto-rhino-laryngologique (ORL) et de la peau (mains). Néanmoins, l'incidence de colonisation chez l'homme sain est assez faible, mais elle augmente lors d'une prescription d'antibiotiques (Hentges *et al.* 1985). La bactérie peut être isolée dans les fèces de 2 à 8 % de la population générale (Hardalo *et Edberg*, 1997).

Après le gavage de souris pendant 60 jours avec 10^7 UFC de *Pseudomonas aeruginosa*, il n'est pas observé, 14 jours après, de colonisation digestive et la bactérie n'est pas retrouvée en quantité importante dans les selles (George *et al.* 1989). Par voie orale, la dose médiane infectante serait de 10^8 UFC chez la souris et de 10^4 à 10^6 UFC chez la souris soumise à une antibiothérapie, selon la nature de l'antibiotique (Mena *et Gerba*, 2009). Par voie intra-nasale, $1,6 \cdot 10^7$ UFC sont nécessaires

pour que la bactérie soit retrouvée dans le tube digestif. Par cette voie, la Dose Létale 50 % (DL50) est de $2,7 \cdot 10^7$ UFC et la mortalité de la souris est certaine dans les 24-36 heures après inoculation de $2,2 \cdot 10^9$ UFC (George et al. 1991).

Chez trois volontaires sains, l'ingestion de différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa*, d'origines diverses (environnementale, fécale, alimentaire et respiratoire), et dans des quantités variant de $5 \cdot 10^2$ à $2 \cdot 10^8$ UFC par administration, il n'est pas constaté de signes cliniques. La souche ingérée est retrouvée dans les selles pour des ingestions de plus de 10^6 UFC et ne donne pas lieu à une colonisation, mais à un simple transit. Seule l'administration concomitante d'antibiotiques a entraîné pour l'un des volontaires la colonisation du tractus intestinal (Buck et Cooke, 1969). Par voie orale, la dose médiane infectante serait de l'ordre de 10^{10} UFC chez l'homme sain et 10^7 UFC chez l'homme soumis à un traitement antibiotique par ampicilline (Rusin et al. 1997). Elle serait plus faible chez le patient immunodéprimé profond sans qu'une valeur puisse être fixée. La relation dose-réponse est donc fonction du terrain de la personne exposée et des thérapeutiques qu'elle peut éventuellement recevoir mais également du génotype de la souche étudiée.

Aucune épidémie n'est reliée à des fontaines à eau contaminée par *Pseudomonas aeruginosa* (Chaidez et Gerba, 2004). Sur 20 épidémies recensées aux Etats-Unis entre 2005 et 2006 et liées à la consommation d'eau du robinet, aucune n'a incriminé la présence de *Pseudomonas* (Yoder et al. 2008). Une épidémie d'infections à *Pseudomonas aeruginosa* liée à de l'eau conditionnée est rapportée chez des patients en réanimation (Eckmanns et al. 2008). Les patients exposés présentaient de graves pathologies sous-jacentes et l'eau était utilisée pour ingestion par sonde nasogastrique, préparation de médicaments et réalisation de soins oropharyngés.

Par d'autres voies d'exposition, *Pseudomonas aeruginosa* peut provoquer une grande variété d'infections. Le contact prolongé avec de l'eau contaminée peut entraîner, chez des personnes saines, des infections oculaires de type kérato-conjonctivite (nettoyage des lentilles de contact), des voies ORL (otites liées à la fréquentation des piscines) et de la peau (folliculites après bains). Chez des personnes ayant un facteur prédisposant, on décrit des colonisations de sites cutanés, après brûlure ou intervention chirurgicale (infections du site opératoire), des infections du système respiratoire de personnes souffrant de maladie sous-jacente (mucoviscidose) et des

infections oculaires après griffure de la cornée (Sarlangue et al. 2006). A partir de ces sites, la bactérie peut passer par voie sanguine et se disséminer dans différents organes. Cette bactérie est surtout une cause fréquente d'infection nosocomiale du fait de sa présence possible dans tous les environnements humides hospitaliers (Exner et al. 2005) à partir desquels le matériel ou les mains des soignants peuvent être contaminés. L'immunodéficience (patients atteints de cancer, d'agranulocytose ou de SIDA) est un facteur prédisposant aux infections nosocomiales (Mena et Gerba, 2009).

> Par voie orale, il n'existe aucune preuve que l'usage normal d'eau de boisson contaminée par *Pseudomonas aeruginosa* puisse être source d'infection dans la population générale. Les cas rapportés sont liés à des populations sensibles et des usages particuliers dans des établissements de santé.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2008) considère *Pseudomonas aeruginosa* comme une bactérie pathogène d'origine hydrique à impact modéré sur la santé, en raison de son faible pouvoir infectieux. Les *Pseudomonas* ne sont pas retenus dans la liste des contaminants de l'eau potable de l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (US-EPA, 2009) en raison de l'absence de preuve épidémiologique de maladies liées à l'ingestion d'eau potable. Pour l'Institut national de veille sanitaire, les *Pseudomonas* ne sont à rechercher qu'en deuxième intention dans les eaux en cas d'infection (Beaudeau et al. 2007).

La caractérisation du risque par voie orale pour la population générale révèle un risque très faible de pathologie liée à *Pseudomonas aeruginosa* pour les concentrations classiquement retrouvées dans l'eau de boisson en France et, pour les personnes ne présentant pas de facteurs de sensibilité particuliers (Rapport Anses, 2010).

En cas d'immunodépression ou de cumul de facteurs de risque (antibiothérapie et immunodépression), le risque existe mais n'a pas pu être estimé.

Faute de données dans la littérature, il n'apparaît pas possible d'évaluer le risque pour les enfants.

Le manque de données pour les autres espèces de *Pseudomonas* ne permet pas de procéder à une évaluation des risques pour les *Pseudomonas* dans leur globalité.

Facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*

➤ Ils peuvent être divisés en deux catégories :

1. les facteurs d'adhésion aux cellules épithéliales, qui comprennent :

- les filaments PstS qui joueraient un rôle dans l'adhérence, la déstabilisation des barrières épithéliales et l'induction d'un phénotype hypervirulent (Long et al. 2008 ; Zaborina et al. 2008)
- la lectine soluble PA-I qui favoriserait l'adhérence, l'augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale et la cytotoxicité (Bajolet-Laudinat et al. 1994)
- les lipopolysaccharides (LPS) membranaires qui pourraient favoriser l'adhérence ou permettre une certaine résistance à des facteurs anti-microbiens de l'hôte (Koh et al. 2005)

2. les métabolites secondaires, toxines ou enzymes excrétés ou secrétés, qui comprennent :

- l'exoenzyme U qui est cytotoxique et provoque le clivage des acides gras membranaires (Phillips et al. 2003)
- les rhamnolipides (hémolysines) qui permettent d'inhiber la motilité des cils vibratiles des cellules épithéliales et d'augmenter la libération des mucines (Adler et al. 1986)
- l'exotoxine A qui agit sur la synthèse protéique (Iglewski et al. 1977), qui possède des propriétés immunosuppressives et se révèle toxique pour les macrophages
- une entérotoxine (exotoxine très labile) qui provoque une accumulation hydrique dans les cellules épithéliales (Baljer et Barret, 1979).
- des sidérophores (pyoverdine et pyocheline) qui permettent la chélation du fer, indispensable à la croissance bactérienne. La pyoverdine formerait un complexe quinolone (Xiao et al. 2006) avec les ions Fe^{3+} et les rhamnolipides, particulièrement toxique (Zaborin et al. 2009)

La plasticité génomique de *Pseudomonas aeruginosa* engendre une multitude de variants génétiques distincts ayant, selon la configuration génétique sélectionnée (acquisitions d'ADN, réarrangements génomiques, mutations particulières) une plus ou moins forte transmissibilité, virulence ou adaptation au milieu colonisé. Il existe donc dans cette espèce des génotypes qui provoqueront des symptômes infectieux plus sévères selon l'organe colonisé.

Les expositions par voies cutanée (hygiène corporelle) ou respiratoire (douche) ne doivent pas être négligées, en particulier pour des patients immunodéprimés, atteints de mucoviscidose ou porteurs de plaies et d'autres effractions cutanéomuqueuses.

Le risque élevé d'infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans les établissements de santé a conduit certains pays, notamment la France, l'Allemagne et la Grande-Bretagne, à proposer une valeur paramétrique (absence dans 100 ml) pour les eaux destinées à l'usage alimentaire et aux soins (Ministère de la Santé et des Solidarités, 2005).

D'autres espèces de Pseudomonades, ou plus spécifiquement certaines souches de ces espèces, sont décrites dans la littérature comme des pathogènes opportunistes dans diverses infections : pulmonaires, oculaires, digestives, cutanées ou oto-rhino-laryngologiques. Leurs facteurs de virulence sont mis en évidence, sans toutefois qu'un lien direct avec la pathologie soit établi.

3.3 Les mycobactéries non tuberculeuses

Les mycobactéries non tuberculeuses (nommées aussi atypiques) sont des bacilles acido-résistants. Elles ont une paroi riche en acides mycoliques à longue chaîne. Ces lipides leur confèrent un caractère hydrophobe qui favorise l'attachement des cellules bactériennes sur les surfaces et la constitution de biofilm. Oligotrophes, elles peuvent proliférer dans des milieux pauvres en éléments nutritifs et sont capables d'utiliser de nombreuses composés organiques volatils dont les acides humique et fulvique présents dans les eaux et les sols. Leur croissance est plus lente que celle d'autres bactéries (temps de génération de 8 à 15 heures), en raison de la synthèse des acides mycoliques et des difficultés d'accès des nutriments hydrophiles.

Elles possèdent des caractéristiques microbiologiques et un pouvoir pathogène expérimental et surtout clinique bien établis qui les distinguent des mycobactéries pathogènes pour l'homme dites "classiques" : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* et *Mycobacterium bovis* (responsables de la tuberculose humaine), *Mycobacterium leprae* (responsable de la lèpre humaine). Elles se caractérisent par une forte

activité catalasique thermostable, une absence de pouvoir pathogène pour le cobaye et une résistance à la plupart des antibiotiques antituberculeux classiques.

Plus de 50 espèces de mycobactéries non tuberculeuses ont été identifiées. Toutefois, en pratique clinique, les espèces isolées se réduisent à une douzaine potentiellement pathogènes pour l'homme et dix habituellement non pathogènes. Leur identification repose sur une classification en quatre groupes (Runyon, 1959), selon deux caractères structuraux, la vitesse de croissance (rapide avec une culture en moins de 7 jours au laboratoire ou lente) et la pigmentation des colonies (chromogène). Ils sont complétés par la distinction entre espèces potentiellement pathogènes pour l'homme de celles qui ne le sont habituellement pas.

Les températures optimales favorisant la croissance des mycobactéries non tuberculeuses sont variables. Si elles tolèrent une gamme étendue de températures, elles présentent des zones optimales de croissance différentes selon les espèces. Certaines mycobactéries comme *Mycobacterium xenopi* sont thermophiles ; d'autres comme *Mycobacterium marinum* ne le sont pas. Peu sensibles aux variations de pH, elles sont

isolées dans des environnements acides et des eaux alcalines.

Les mycobactéries non tuberculeuses sont ubiquitaires dans l'environnement (tableau 1) et se caractérisent par de grandes capacités d'adaptation. Elles sont largement répandues dans le sol, la végétation, la poussière et toutes catégories d'eau. L'étude menée pendant 2 ans (2007 - 2008) sur les filières de traitement, les réservoirs et les points de distribution sur le réseau public de la ville de Paris confirme la large répartition des mycobactéries non tuberculeuses dans les circuits d'eau. Cette ubiquité révèle une tolérance élevée vis-à-vis des variations des paramètres physicochimiques et microbiologiques du milieu. Certaines espèces, telles *M. avium*, peuvent se multiplier à l'intérieur de protozoaires, hôtes habituels des milieux hydriques.

Les mycobactéries non tuberculeuses sont particulièrement résistantes aux agents physiques et chimiques, en raison de la richesse en lipides de la paroi bactérienne. Le Ct 99,9 % du chlore libre est 1 000 fois plus élevé que pour les bactéries d'origine fécale (*Escherichia coli*) et celui de l'ozone est 50 fois plus élevé pour *M. avium*. Des différences de sensibilité existent selon les

TABLEAU 3-1 : principales espèces de mycobactéries non tuberculeuses présentes dans l'environnement et pouvant être isolées en clinique humaine

<i>M. aurum</i>	Sol	<i>M. marinum</i>	Eau de mer, estuaires, piscines, aquarium
<i>M. avium</i>	Sol, eau, poussière, végétation	<i>M. parafortuitum</i>	Sol
<i>M. chelonae</i>	Sol, eau douce, potable, distillée	<i>M. smegmatis</i>	Sol, eau de mer, piscine
<i>M. flavescens</i>	Eau de mer, eau douce	<i>M. szulgai</i>	Eau de piscine
<i>M. fortuitum</i>	Sol, eau, poussière, végétation	<i>M. terrae</i>	Sol, eau de mer, eau douce, végétation
<i>M. gordonae</i>	Sol, eau, nappes souterraines	<i>M. vaccae</i>	Sol, eau de mer, eau douce
<i>M. intracellulare</i>	Sol, eau	<i>M. xenopi</i>	Eau potable, eau distillée
<i>M. kansasii</i>	Eau potable et distillée, piscine		

^a Toutes les catégories d'eau : eau de mer, étangs, eau potable, piscines, eau distillée.

espèces : *M. fortuitum* et *M. chelonae* sont beaucoup plus résistantes au chlore libre que *M. gordonae*. Le traitement par rayonnement ultraviolet appliqué à une dose de 400 J/m² assure globalement une efficacité du même ordre pour les mycobactéries non tuberculeuses que pour les autres bactéries sous forme végétative. Des différences existent selon les espèces : *M. avium* (réduction de 4 log pour une dose de 200 J/m²), *M. terrae* (2 log avec 100 J/m²), *M. fortuitum* (3 log avec 500 J/m²).

Les données épidémiologiques mettent en évidence le rôle de l'eau dans la transmission des infections à mycobactéries non tuberculeuses au travers de l'inhalation, l'aspiration, l'inoculation ou le contact.


L'espèce la plus pathogène est *Mycobacterium kansasii*, capable de provoquer une maladie en

l'absence de cause favorisante si la charge bactérienne est élevée. Les autres mycobactéries non tuberculeuses se comportent comme des saprophytes mais certaines d'entre elles sont des pathogènes opportunistes. Elles deviendront pathogènes dans trois circonstances :

- introduction accidentelle dans l'organisme (p.ex. *M. marinum*, par contact avec l'eau d'un aquarium) ou nosocomiale (p. ex. *M. xenopi* et spondylodiscites) ;
- lésions préexistantes pulmonaires (p.ex. *M. xenopi* ou *M. avium* sur tuberculose ou dilatation des bronches) ;
- immunodépression (p.ex. sida, maladie systémique, traitements immunosuppresseurs).

Une composante génétique pourrait expliquer la variabilité individuelle de susceptibilité à

Prévalence des mycobactéries non tuberculeuses dans les réseaux de distribution d'eau de Paris

 **Prévalence des mycobactéries non tuberculeuses dans les réseaux de distribution d'eau de Paris (2007 - 2008) Dubrou et al. 2010**

Près de 95 % (492/520) des échantillons d'eau prélevés sur les 30 points du réseau public présentent une flore mycobactérienne. Les concentrations dans le réseau augmentent dès qu'on s'éloigne du réservoir :

- UDI alimentée en eau souterraine :
sortie de réservoir : dénombrements < 1 000 UFC/l
point du réseau : 22 % des dénombrements > 1 000 UFC/l
- UDI alimentée en eau de surface :
sortie de réservoir : 74 % dénombrements 100 à > 1 000 UFC/l
point du réseau : 83 % dénombrements 100 à > 1000 UFC/l

La flore mycobactérienne des eaux d'origine superficielle est plus diversifiée (10 espèces identifiées, dont 6 mycobactéries à croissance rapide non chromogènes) que celle des eaux souterraines (6 espèces identifiées dont 5 mycobactéries à croissance rapide non chromogènes).

L'identification des souches de mycobactéries à croissance rapide non chromogènes identifiées dans le réseau de distribution parisien en 2007 - 2008 est présenté ci-après :

Réseau alimenté en eaux souterraines
(nombre de souches = 72)

<i>M. llazerense</i> :	22 (31 %)
<i>M. chelonae</i> :	15 (21 %)
<i>M. sp.</i> :	12 (17 %)
<i>M. setense</i> :	11 (15 %)
<i>M. peregrinum</i> :	6 (8 %)
<i>M. salmoniphilum</i> :	6 (8 %)

Réseau alimenté en eaux souterraines
(nombre de souches = 113)

<i>M. chelonae</i> :	47 (41 %)
<i>M. llazerense</i> :	29 (25 %)
<i>M. sp.</i> :	14 (12 %)
<i>M. setense</i> :	13 (12 %)
<i>M. peregrinum</i> :	4 (4 %)
<i>M. salmoniphilum</i> :	4 (4 %)
<i>M. septicum</i> :	2 (2 %)

l'infection. Le déficit en récepteurs de l'interféron-gamma (IFN-gamma) comme celui en interleukine-12 (IL-12), qui touchent l'enfant et l'adulte, est marqué par une susceptibilité sévère et sélective vis-à-vis des mycobactéries peu virulentes.

L'épidémie de sida a été responsable, non seulement d'une augmentation de fréquence des infections cliniques à mycobactéries non tuberculeuses, surtout pulmonaires, mais d'une plus grande fréquence d'isolement en laboratoire de ces bactéries, ainsi que d'une profonde modification de la distribution des espèces potentiellement pathogènes pour l'homme : *Mycobacterium avium-intracellulare* est responsable de plus de 80 % des mycobactérioses du sida, alors que *Mycobacterium kansasii* et *Mycobacterium xenopi* infectent avec prédilection les sujets qui n'ont pas la sida. Chez l'homme, 95 % des infections sont liées à *M. kansasii*, *M. avium*, *M. xenopi*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum* et *M. marinum*.

Chez l'homme, les voies aériennes supérieures, le tractus digestif et la peau sont les tissus les plus souvent colonisés. A partir de ceux-ci, une infection à distance peut se développer surtout en cas d'immunodépression. Les mieux documentées sont les infections cutanées à *M. marinum* qui affectent avec prédilection les aquariophiles, les professions en contact avec les poissons et le public fréquentant les piscines. *M. abscessus* est à l'origine d'infections pulmonaires chez des patients porteurs d'anomalies de l'arbre respiratoire (mucoviscidose,...).

En milieu hospitalier, la colonisation par *M. fortuitum* des voies aériennes supérieures est constatée chez des patients après contamination de l'eau. Une épidémie de pneumopathies à *M. xenopi* est décrite chez 19 malades d'un même hôpital où le réseau d'eau était contaminé. Les douches, par la formation d'aérosols, peuvent avoir un rôle dans la propagation de telles épidémies. Des infections nosocomiales liées à des actes médicaux ou chirurgicaux peuvent également survenir ; il en est ainsi des actes d'endoscopie, des gestes invasifs de types tatouage ou piercing, de la dialyse péritonéale, des transplantations ou de la pose de prothèses, mais aussi de la mésothérapie. La source de l'infection se trouve souvent dans des solutions désinfectantes, utilisées pour désinfecter le matériel utilisé. Une épidémie de spondylodiscites à *Mycobacterium xenopi* est survenue dans une clinique parisienne après des nucléotomies percutanées. Certains nucléotomes étaient rincés, après leur désinfection au glutaraldéhyde et

avant réutilisation, avec une eau microfiltrée que l'on croyait à tort stérile. L'eau était contaminée par *M. xenopi* par l'intermédiaire du réseau d'eau de la clinique. *M. xenopi*, habituellement peu virulente, présente en grande quantité dans les réseaux d'eau potable, peut devenir agent pathogène dès lors qu'elle sera introduite par le nucléotome dans le disque intervertébral.

3.4 La flore microbienne revivifiable

Les micro-organismes "hétérotrophes" ont besoin de composants organiques pour leur croissance et jouent un rôle essentiel dans le cycle de la matière organique dans l'environnement tellurique, aquatique, aérien, végétal.

La population microbienne hétérotrophe, présente dans les eaux destinées à la consommation humaine, est mesurée par la norme NF EN ISO 6222 (dénombrement des micro-organismes revivifiables à 22° C et à 36° C) ou autrefois par le test HPC (Heterotrophic Count Plate) qui utilisent un milieu de culture nutritif gélosé non sélectif. L'analyse ne peut mesurer qu'une fraction des micro-organismes hétérotrophes présents dans l'eau, c'est-à-dire ceux qui sont cultivables dans les conditions choisies ; ce pourcentage peut être inférieur à 1 %, voire 1 ‰ du nombre total de micro-organismes comptés après coloration par l'acridine orange. Elle ne peut distinguer les micro-organismes pathogènes de ceux qui ne le sont pas. Certaines bactéries d'intérêt sanitaire, comme les *Legionella* ou les mycobactéries non tuberculeuses, ne peuvent pas se développer dans les conditions de cette analyse.

Le dénombrement des micro-organismes revivifiables est habituellement utilisé pour contrôler l'efficacité des traitements de l'eau destinée à la consommation humaine, en particulier de la désinfection, et pour surveiller la qualité de l'eau traitée au cours de la distribution et du stockage.

Des dénombrements élevés en micro-organismes revivifiables, dépassant les critères définis dans la réglementation, sont le signal le plus communément observé d'une dégradation de la qualité microbiologique des systèmes de distribution d'eau. L'accroissement de la flore microbienne revivifiable entre l'eau analysée à l'entrée d'un bâtiment et l'eau analysée au point d'usage té-

moigne d'anomalies techniques du réseau intérieur de distribution ou d'une contamination du point d'usage. La croissance de ces micro-organismes est associée à des conséquences esthétiques (présence de floccs, d'une turbidité ou d'organismes invertébrés) et organoleptiques, altérant le goût et l'odeur de l'eau (Burman et Colbourne, 1977 ; Schoenen et Schöler, 1983 ; Van Lieverloo *et al.* 1994).

Il n'existe actuellement aucune donnée indiquant que les micro-organismes hétérotrophes puissent être directement associées à un risque pour la santé du consommateur (Leclerc, 2003). Le dénombrement des micro-organismes revivifiables ne peut en conséquence être utilisé comme un critère de santé publique. Il ne peut davantage être un indicateur de la présence de micro-organismes pathogènes opportunistes (Schubert et Blum, 2002 ; Galassi *et al.* 2002).

3.5 Les *Aeromonas*

Les *Aeromonas* comprennent deux groupes : une espèce psychrophile, *Aeromonas salmonicida*, responsable de maladie chez les poissons, en particulier les salmonidés, et les 16 espèces mésophiles, à l'origine d'infections humaines, dont *Aeromonas hydrophila* (Nichols *et al.* 2002).

Les *Aeromonas* sont des hôtes naturels de l'environnement aquatique, principalement des eaux douces, qui peuvent atteindre de numérations de 10^4 à 10^3 UFC/ml dans les eaux de rivière et de 10^6 à 10^8 UFC/ml dans les eaux usées domestiques (Schubert, 1991). Les *Aeromonas* colonisent les canalisations d'eau avec des fréquences et des numérations très variables selon les réseaux (Leclerc et Buttiaux, 1962 ; Havelaar *et al.* 1990 ; Schubert, 1991 ; Krovacek *et al.* 1992 ; WHO 2002) où leur présence peut être confondue avec celle des bactéries coliformes. En dépit de leur relative sensibilité aux produits chlorés, ils se fixent dans les biofilms et entrent en compétition avec les bactéries indigènes pour utiliser les multiples composés organiques de l'eau.

Les *Aeromonas* sont des pathogènes opportunistes ou nosocomiaux, incriminés dans des infections de plaies à la suite de contact avec l'eau (baignade, pêche, canotage,...), d'infections pulmonaires après noyade, de bactériémies chez des sujets fragilisés ou immunodéprimés et dans des gastro-entérites ou d'entérites banales, de faible durée et autolimitantes, après consommation d'eau ou d'aliments contaminés.

Selon Edberg et Allen (2002), il n'y aurait pas d'arguments suffisants pour considérer les *Aeromonas* des eaux d'alimentation comme des bactéries entéropathogènes, même si des facteurs de virulence ont été décrits chez un faible pourcentage de souches : une bêta-hémolyse d'activité cytotoxique, dermonécrotique et létale pour la souris, une entérotoxine cytotoxique, des protéases (Stelma *et al.* 1986 ; Janda, 1991). Dans les enquêtes épidémiologiques, il y a peu de similitude entre les souches isolées de l'eau et les cas de diarrhées.

3.6 Bactéries coliformes

Les coliformes dits "totaux" constituent un groupe hétérogène de bactéries d'origines fécale et environnementale. La plupart des espèces de bactéries coliformes se trouvent naturellement dans le sol et la végétation, telles que *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp.

La croissance des bactéries coliformes peut être favorisée par des sédiments et des interactions entre les composés organiques de l'eau et la surface de canalisations corrodées (Baylis, 1930 ; Camper *et al.* 1999). Certains matériaux tels que le bois, le cuir, les enduits, les lubrifiants favorisent également leur croissance (Burman et Colbourne, 1977 ; Seidler *et al.* 1997 ; Ellgas et Lee, 1980 ; Schoenen et Schöler, 1983).

La présence de coliformes totaux n'indique pas une contamination fécale, ni un risque sanitaire, mais plutôt une dégradation de la qualité microbiologique de l'eau. Cette dégradation témoigne d'une vulnérabilité du système de distribution d'eau à la pollution environnementale ; elle peut être attribuée, entre autres facteurs, à une infiltration d'eau de surface dans un réservoir, à des travaux ou à une contamination du point d'usage.

La présence de coliformes thermotolérants (*Escherichia coli*) représente un danger pour le consommateur par l'apparition de symptômes gastro-entériques : diarrhées et vomissements. Les données épidémiologiques montrent que ces symptômes sont à faible bruit, ne sont pas identifiés par le système médical et ne sont mis en évidence qu'au travers d'études spécifiques de populations exposées.

Les différents états physiologiques des bactéries

➤ Depuis Pasteur et jusqu'à ces dernières années, la viabilité cellulaire chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif non sporulantes était donnée comme équivalente à la cultivabilité. Ainsi, toutes bactéries incapables de former une colonie visible par l'observateur étaient considérées comme non viables ou mortes.

En fait, les bactéries peuvent se trouver sous différents états :

L'état viable : la viabilité est associée à la capacité de la bactérie à se multiplier ou à exprimer des caractères physiologiques qui suggèrent l'existence d'une intégrité membranaire, d'une activité métabolique (activité enzymatique intracellulaire, activité respiratoire, etc.).

L'état cultivable : la cultivabilité est la faculté que présente une bactérie à former en un temps donné, et sur un milieu de culture gélosé défini, une colonie visible par l'observateur. Cette définition intègre des notions de développement, de temps, de sensibilité, et de qualité du milieu de culture utilisé. Dans les cultures en milieu liquide, la croissance se traduit par une turbidité du milieu.

L'état viable non cultivable (VBNC) : il caractérise les bactéries qui perdent leur cultivabilité, tout en conservant une certaine forme de viabilité se traduisant par la conservation de l'intégrité membranaire structurale et/ou des activités métaboliques. La présence de bactéries viables non cultivables est généralement observée en association avec des conditions environnementales particulières ou liée à des stress. La perte de cultivabilité peut être une réaction adaptative à ces conditions (état de quiescence) ou au contraire un processus dégénératif (état transitoire vers la mort cellulaire) ou encore inhérent à la méthode de culture utilisée. Dans certaines conditions de culture ou à la suite des modifications de l'environnement, les bactéries viables non cultivables peuvent retrouver leur cultivabilité.

Différents facteurs chimiques et environnementaux sont soupçonnés de provoquer l'état VBNC, dont l'indisponibilité des nutriments ou les traitements chimiques et thermiques de l'eau (Oliver, 2000 ; Oliver, 2009). En plus de la capacité à survivre dans les biofilms, et éventuellement au sein des protozoaires, l'entrée en état VBNC constitue

pour la bactérie une forme de survie dans des conditions environnementales défavorables. La résistance réelle de la bactérie sous l'état VBNC aux traitements chimiques n'est pas connue, mais celle-ci serait potentiellement accrue par rapport à celle de l'état cultivable. En effet, une augmentation de la résistance à des substances chimiques, telles que des antibiotiques, et une capacité améliorée à surmonter divers stress thermiques ou acides, ont été décrits pour de nombreuses espèces bactériennes lorsqu'elles sont dans l'état VBNC (Oliver, 2009).

Seules les bactéries viables peuvent être à l'origine d'infections humaines et représenter un enjeu sanitaire. Parmi les bactéries viables, il est difficile de démontrer l'infectiosité des bactéries VBNC, car il n'est actuellement pas possible de démontrer que 100 % des bactéries sont dans l'état VBNC dans une culture travaillée pour en produire (Delgado-Viscogliosi, 2005). Il est toutefois probable que les bactéries VBNC puissent représenter un risque sanitaire, car elles peuvent retrouver leur capacité de multiplication lorsque les conditions sont favorables (Bej et al. 1991 ; Hwang et al. 2006 ; Dusserre et al. 2008 ; Delgado-Viscogliosi et al. 2009). En outre, il a été démontré que les *Legionella pneumophila* VBNC peuvent retrouver leur cultivabilité au contact d'amibes de l'espèce *Acanthamoeba castellanii* (Steinert et al. 1997). *Legionella pneumophila* peut aussi retrouver sa cultivabilité, perdue après un traitement de désinfection au chlore, par un passage dans l'amibe *Acanthamoeba polyphaga* (Garcia et al. 2007 ; Oliver, 2009).

L'existence de l'état VBNC pourrait expliquer en partie les recontaminations rapides parfois observées après le traitement d'un circuit d'eau par choc thermique ou chloration (Steinert et al. 1998 ; Thomas et al. 2004), alors que la recherche de *Legionella* par culture est négative. Pour évaluer son rôle exact, il est également nécessaire de prendre en compte une possible présence de *Legionella* (cultivable ou non) dans le biofilm ou dans les amibes (Allegra et al. 2008).

L'état non viable : il est caractérisé par la perte de la cultivabilité, de l'intégrité structurale et des activités métaboliques (bactéries lysées ou mortes).

4.1 Les textes français

Le code de la santé publique (CSP)

Le code de la santé publique (article L.1321-1) précise que *“toute personne qui offre au public de l'eau en vue de l'alimentation humaine, à titre onéreux ou à titre gratuit, et sous quelque forme que ce soit, y compris la glace alimentaire, est tenu de s'assurer que cette eau est propre à la consommation. L'utilisation d'eau impropre à la consommation pour la préparation et la conservation de toutes denrées et marchandises destinées à l'alimentation humaine est interdite”*.

Le code de la santé publique (article R.1321-1) définit les eaux destinées à la consommation humaine comme :

- toutes les eaux qui, soit en l'état, soit après traitement, sont destinées à la boisson, à la cuisson, à la préparation d'aliments ou à d'autres usages domestiques, qu'elles soient fournies par un réseau de distribution, à partir d'un camion-citerne ou d'un bateau-citerne, en bouteilles ou en conteneurs, y compris les eaux de source.

➤ Dans un avis du 5 septembre 2006, le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France a proposé une définition des usages domestiques :

“la notion d'usages domestiques recouvre généralement :

- les usages alimentaires : boisson, préparation des aliments, lavage de la vaisselle,
- les usages liés à l'hygiène corporelle : lavabo, douche, bain, lavage du linge,
- les usages dans l'habitat (évacuation des excréta, lavage des sols,...) et usages connexes (arrosage des espaces verts, arrosage du potager, lavages des sols et des véhicules,...”

- toutes les eaux utilisées dans les entreprises alimentaires pour la fabrication, la transformation, la conservation ou la commercialisation de produits ou de substances, destinées à la consommation humaine, qui peuvent affecter la salubrité de la denrée alimentaire finale, y compris la glace alimentaire d'origine hydrique.

Les réseaux intérieurs de distribution d'eau

Outre les installations de production, les installations de distribution d'eau comprennent, selon l'article R.1321-43 du code de la santé publique :

1. les réseaux publics de distribution, qui incluent les branchements publics reliant le réseau public au réseau intérieur de distribution.
2. les installations non raccordées aux réseaux publics de distribution dont les résultats ont obtenu l'autorisation préfectorale de prélèvement d'eau dans le milieu naturel à des fins de consommation humaine.
3. le réseau intérieur de distribution équipant les immeubles desservis par les réseaux ou installations précédentes, mentionnées en 1- et 2-, qui comprend :

- l'installation privée de distribution d'eau destinée à la consommation humaine, c'est-à-dire les canalisations et appareillages installés entre les robinets qui sont normalement utilisés pour la consommation humaine et le réseau public de distribution, qu'elle fournisse ou non de l'eau au public ;
- les autres réseaux de canalisations, réservoirs et équipements raccordés de manière permanente ou temporaire.

Dans la conception des réseaux intérieurs, il est souvent nécessaire de distinguer un plus grand nombre de réseaux-types (RT) afin de mieux assurer leur protection mutuelle et d'en permettre leur exploitation rationnelle et leur surveillance efficace.

Selon les types de bâtiments, l'organisation des réseaux intérieurs ne sera pas toujours la même. Elle doit cependant respecter les règles suivantes :

- séparation des réseaux-types véhiculant une eau destinée à la consommation humaine et des réseaux-types distribuant une eau destinée à d'autres usages. L'eau chaude sanitaire est classée parmi les eaux destinées à la consommation humaine.
- de manière plus générale, individualisation des réseaux-types véhiculant une eau de catégorie différente (tableau 4-1) ;
- séparation des réseaux intérieurs alimentés par le réseau public et des réseaux intérieurs alimentés par d'autres ressources en eau ;

TABLEAU 4-1 : organisation d'un réseau intérieur en réseaux-types

Code	Définition	Observation
RT1	Réseau d'eau destinée à la consommation humaine, parfois appelé "réseau sanitaire"	
RT1a	Réseau d'eau froide sanitaire - partie collective	Réseau-type partant du compteur
RT1b	Réseau d'eau froide sanitaire - partie privative	Piqué sur RT1a
RT1c	Réseau d'eau chaude sanitaire - partie collective	Piqué sur RT1a
RT1d	Réseau d'eau chaude sanitaire - partie privative	Piqué sur RT1a ou RT1c
RT1e	Réseau d'eau traitée pour des usages particuliers occasionnant une exposition humaine directe (ex. piscine, dialyse) ou indirecte (ex. stérilisation, four vapeur)	Piqué sur RT1a
RT2	Réseau d'eau destinée à des usages techniques (usages liés au remplissage des circuits de chauffage, à la climatisation - eau glacée - ainsi qu'au lavage et/ou à l'arrosage lorsqu'il est fait appel à des robinets de puisage situés en élévation à une hauteur d'au moins 0,40 m du sol avoisinant)	
RT3	Réseau d'eau destinée à la protection incendie	Un compteur et un branchement séparés sont recommandés
RT4	Réseau d'eau destinée à l'arrosage par hydrant sur le sol ou enterré	
RT5	Réseau d'eau destinée à des activités spécifiques (activités de type industriel, buanderies, portiques de lavage,...)	

- détermination d'un nombre raisonnable de réseaux-types ;
- respect d'une taille critique de réseau-type afin d'en assurer le renouvellement par le tirage naturel d'eau.

Les obligations réglementaires

Les propriétaires des réseaux d'eau intérieurs des immeubles et des établissements sont tenus de respecter les obligations réglementaires du code de la santé publique (articles L.1321-1, R.1321-1 et suivants) relatives aux eaux destinées à la consommation humaine.

Ces obligations portent notamment sur les points suivants.

1. le respect des limites et références de qualité réglementaires

L'eau distribuée doit respecter, au niveau de l'ensemble des robinets des usagers, les limites et références de qualité réglementaires ; ces exigences de qualité portent à la fois sur des paramètres microbiologiques (tableau 4-2) et des paramètres physico-chimiques, témoins en particulier de la non-altération de la qualité de l'eau par les matériaux des réseaux d'eau (fer, cuivre, nickel, plomb,...).

TABLEAU 4-2 : Paramètres microbiologiques des eaux destinées à la consommation humaine pour la population générale

Paramètres microbiologiques	Limite de qualité	Référence de qualité
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	0/100 ml	
Entérocoques	0/100 ml	
Bactéries coliformes		0/100 ml
Bactéries sulfito-réductrices y compris les spores*		0/100 ml
Numération de germes aérobies revivifiables à 22° C et à 37° C		Variation dans un rapport de 10 par rapport à la valeur habituelle

* Ce paramètre doit être mesuré lorsque l'eau est d'origine superficielle ou influencée par une eau d'origine superficielle. En cas de non-respect de cette valeur, un enquête doit être menée sur la distribution d'eau pour s'assurer qu'il n'y a aucun danger potentiel pour la santé humaine résultant de la présence de micro-organismes pathogènes, par exemple des *Cryptosporidium*.

➤ **Les critères de qualité des eaux destinées à la consommation humaine sont définis par les articles R.1321-2 et R.1321-3 du code de la santé publique :**

- elles doivent ne pas contenir un nombre ou une concentration de micro-organismes, de parasites ou de toute autre substance constituant un danger potentiel pour la santé des personnes, et être conformes aux limites de qualité pour les paramètres microbiologiques et les substances chimiques dont la présence dans l'eau présente des risques immédiats ou à plus long terme pour la santé du consommateur ;
- et satisfaire à des références de qualité, valeurs indicatives établies à des fins de suivi des installations de production et de distribution d'eau et d'évaluation de risques pour la santé des personnes. Ces substances, sans incidence directe sur la santé aux teneurs normalement présentes dans l'eau, peuvent mettre en évidence un dysfonctionnement des installations de traitement ou être à l'origine d'inconfort ou de désagrément pour le consommateur.

2. la surveillance permanente de la qualité de l'eau délivrée au consommateur

Cette surveillance intègre nécessairement l'examen périodique des installations de distribution d'eau, la tenue et la mise à jour régulière d'un carnet sanitaire des installations, et éventuellement la réalisation d'analyses complémentaires en fonction des dangers identifiés (article CSP R.1321-23).

3. l'information du consommateur et des autorités sanitaires

Le propriétaire d'un réseau d'eau intérieur d'un immeuble ou d'un établissement est tenu d'informer le consommateur en cas de problème de qualité de l'eau distribuée et les autorités sanitaires en cas d'incident pouvant avoir des conséquences pour la santé publique (article CSP L.1321-4). Il est tenu également de mettre en œuvre des analyses complémentaires à la demande des autorités sanitaires, notamment en cas de risques pour la santé en relation avec l'usage de l'eau distribuée.

4. la construction des réseaux avec des matériaux conformes

Les matériaux et objets en contact avec l'eau doivent être conformes à des dispositions spécifiques définies par arrêté du ministre chargé de la santé (article R.1321-48 du code de la santé publique – décret du 11 janvier 2007). Les dispositions spécifiques à respecter pour les différents groupes de matériaux et objets entrant en contact avec l'eau sont celles définies par les annexes de l'arrêté du 29 mai 1997 modifié. Les matériaux et objets de type organique doivent avoir une attestation de conformité sanitaire.

5. l'utilisation de produits et procédés de traitement de l'eau autorisés

Les dispositifs de traitement complémentaire de la qualité de l'eau sont réglementés par l'article R.1321-55 du code de la santé publique. Ils doivent respecter les dispositions de la circulaire DGS/VS4 n°99-360 du 21 juin 1999 relative aux appareils individuels de traitement des eaux destinées à la consommation humaine au robinet.

Lorsque ces dispositifs de traitement complémentaires de la qualité de l'eau utilisent des produits et procédés de traitement, ceux-ci doivent bénéficier d'une autorisation du ministre chargé de la santé, prise après avis de l'agence nationale de sécurité sanitaire (Anses) (article R.1321-48 du code de la santé publique). Sont autorisés les produits et procédés de traitement (i) figurant dans la circulaire n°2000/166 du 28 mars 2000 relative aux produits et procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine (ii) figurant dans les annexes 2 et 3 de la circulaire du 7 mai 1990 relative à la mise à jour de la liste des produits et procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine (iii) et, le cas échéant, ceux bénéficiant d'une autorisation d'utilisation ponctuelle délivrée par le ministre chargé de la santé.

Les produits utilisés pour le nettoyage et la désinfection des installations de distribution d'eau destinée à la consommation humaine doivent respecter les dispositions de l'article R.1321-50 du code de la santé publique qui prévoit que ces produits doivent être composés de constituants autorisés dans les conditions fixées par le décret n°73-138 du 12 février 1973 modifié. L'arrêté du 8 septembre 1999, pris pour l'application de l'article 11 du décret précité, liste les constituants autorisés dans les produits de nettoyage des matériaux et objets destinés à être mis en contact des denrées alimentaires. Des produits ont fait l'objet d'auto-

► Le programme de surveillance D1 comprend outre les paramètres microbiologiques cités précédemment, un certain nombre de paramètres physico-chimiques : couleur, turbidité, saveur, chlore libre et total (ou tout autre paramètre représentatif du traitement de désinfection), température de l'eau froide sanitaire, pH, conductivité, aluminium (lorsqu'il est utilisé comme agent de floculation), ammonium, nitrates (si plusieurs ressources en eaux au niveau de l'unité de distribution dont une au moins délivre une eau dont la concentration en nitrates est supérieure à 50 mg/l).

Les analyses complémentaires du programme de surveillance D2 comprennent les paramètres chimiques suivants : plomb, cuivre, cadmium, zinc, chrome, nickel, fer total, carbone organique total.

risation individuelle et l'utilisation faite de ces produits doit être conforme aux préconisations prévues dans l'autorisation.

6. la possibilité pour le consommateur d'avoir accès à une eau froide non traitée

Chaque consommateur doit avoir accès à une eau froide non soumise aux traitements complémentaires mis en œuvre sur les réseaux d'eau de l'immeuble ou de l'établissement (article CSP R.1321-53). Par exemple, chaque consommateur doit disposer d'un point d'eau non traitée lorsque l'eau froide distribuée fait l'objet d'un traitement d'adoucissement.

Les textes spécifiques

En complément des dispositions générales du code de la santé publique, des dispositions spécifiques incombent aux responsables d'immeubles (habitations, locaux de travail) et d'établissements qui accueillent des populations particulièrement vulnérables aux risques liés à la présence de légionelles ou d'autres micro-organismes pathogènes opportunistes dans les réseaux d'eau intérieurs.

La prévention de la légionellose

• Maîtrise de la température

Les propriétaires des réseaux d'eau intérieurs des immeubles et des établissements sont tenus de mettre en place les mesures nécessaires à une bonne maîtrise de la température de l'eau qui doit constituer un objectif essentiel à la prévention de la prolifération des légionelles dans les réseaux d'eau. Les obligations réglementaires relatives à la température de l'eau sont les suivantes.

► La température de l'eau froide sanitaire doit être inférieure à 25° C (hors départements d'outre-mer). Il s'agit de la référence de qualité mentionnée dans l'arrêté ministériel du 11 janvier 2007 relatif aux limites et aux références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine.

Pour l'eau chaude sanitaire, les consignes de température ont été précisées dans l'arrêté interministériel du 30 novembre 2005 relatif aux installations fixes destinées au chauffage et à l'alimentation en eau chaude sanitaire des bâtiments d'habitation, de bureaux ou locaux recevant du public. Elles s'appliquent à l'ensemble des réseaux d'eau neufs ou entièrement renouvelés à partir du 15 décembre 2006. Les modalités d'application de cet arrêté sont explicitées dans la circulaire DGS/DSC/DGUHC/DGE/DPPR n°126 du 3 avril 2007.

1. Afin de limiter le risque de brûlure :

- dans les pièces destinées à la toilette, la température maximale de l'eau chaude sanitaire est fixée à 50° C aux points de puisage ;
- dans les autres pièces, la température de l'eau chaude sanitaire est limitée à 60° C aux points de puisage ;
- dans les cuisines et les buanderies des établissements recevant du public, la température de l'eau distribuée pourra être portée au maximum à

90° C en certains points faisant l'objet d'une signalisation particulière.

2. Afin de limiter le risque lié au développement des légionelles dans les systèmes de distribution d'eau chaude sanitaire sur lesquels sont susceptibles d'être raccordés des points de puisage à risque (douches, douchettes), les exigences suivantes doivent être respectées pendant l'utilisation des systèmes de production et de distribution d'eau chaude sanitaire et dans les 24 heures précédant leur utilisation :

- lorsque le volume entre le point de mise en distribution et le point de puisage le plus éloigné est supérieur à 3 litres, la température de l'eau doit être supérieure ou égale à 50° C en tout point du système de distribution, à l'exception des tubes finaux d'alimentation des points de puisage. Le volume de ces tubes finaux d'alimentation est le plus faible possible, et dans tous les cas inférieur ou égal à 3 litres ;
- lorsque le volume total des équipements de stockage est supérieur ou égal à 400 litres, l'eau contenue dans les équipements de stockage, à l'exclusion des ballons de préchauffage, doit être en permanence à une température supérieure ou égale à 55° C à la sortie des équipements ou être portée à une température suffisante au moins une fois par 24 heures (cas des ballons à accumulation) (tableau 4-3).

TABLEAU 4-3 : durée minimale d'élévation quotidienne de la température de l'eau dans les équipements de stockage, à l'exclusion des ballons de préchauffage

Temps minimum de maintien de la température	Température de l'eau (°C)
2 minutes	supérieure ou égale à 70 °C
4 minutes	65° C
60 minutes	60° C

Surveillance des légionelles dans les installations d'eau chaude sanitaire

L'arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations collectives de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire fixe les prescriptions techniques

applicables aux installations qui alimentent les établissements de santé, les établissements sociaux et médico-sociaux, les établissements pénitentiaires, les hôtels et résidences de tourisme, les campings et les autres établissements recevant du public qui possèdent des points d'usage à risque (douches, douchettes, bains à remous ou à jets).

➤ *Le responsable des installations met en œuvre une surveillance de ses installations afin de vérifier que les objectifs cibles en Legionella pneumophila sont respectés en permanence au niveau de tous les points d'usage à risque. Lorsque ces seuils ne sont pas respectés, le responsable des installations prend sans délai les mesures correctives nécessaires au rétablissement de la qualité de l'eau et à la protection des usagers. Les dénombrements en Legionella pneumophila doivent être inférieurs à 1 000 unités formant colonie par litre d'eau au niveau de tous les points d'usage à risque (norme NF T90-431 réalisée par un laboratoire accrédité). Dans les établissements de santé, les dénombrements en Legionella pneumophila doivent être inférieurs*

au seuil de détection au niveau de tous les points d'usage à risque accessibles à des patients identifiés par le comité de lutte contre les infections nosocomiales ou toute organisation chargée des mêmes attributions comme particulièrement vulnérables au risque de légionellose. Cette surveillance repose notamment sur des mesures de la température de l'eau et des campagnes d'analyse de légionelles dans chacun des réseaux d'eau chaude sanitaire, aux fréquences de contrôle minimales précisées dans le tableau 4-4 pour les établissements de santé et dans le tableau 4-5 pour les autres établissements. Le choix des points de surveillance relève d'une stratégie d'échantillonnage qui tient compte du nombre de points d'usage à risque.

TABLEAU 4-4 : Fréquences minimales des analyses de légionelles et des mesures de la température de l'eau chaude sanitaire dans les établissements de santé

Points de surveillance	Mesures obligatoires pour chacun des réseaux d'eau chaude sanitaire
Sortie de la/des production(s) d'eau chaude sanitaire (mise en distribution)	Température de l'eau : 1 fois par jour (ou en continu)
Fond de ballon(s) de production et de stockage d'eau chaude sanitaire, le cas échéant	Analyses de légionelles : 1 fois par an - dans le dernier ballon si les ballons sont installés en série - dans l'un d'entre eux si les ballons sont installés en parallèle
Point(s) d'usage à risque le(s) plus représentatif(s) du réseau et point(s) d'usage le(s) plus éloigné(s) de la production d'eau chaude sanitaire	Analyses de légionelles : 1 fois par an Analyses de légionelles : 1 fois par an Température de l'eau : 1 fois par semaine (ou en continu)
Points d'usage représentatifs situés dans les services accueillant des patients identifiés par le comité de lutte contre les infections nosocomiales (ou toute autre organisation chargée des mêmes attributions) comme particulièrement vulnérables au risque de légionellose	Analyses de légionelles : 1 fois par an Température de l'eau : 1 fois par semaine (ou en continu)
Retour de boucle (retour général), le cas échéant	Analyses de légionelles : 1 fois par an Température de l'eau : 1 fois par jour (ou en continu) au niveau de chaque boucle

TABLEAU 4-5 : Fréquences minimales des analyses de légionelles et des mesures de la température de l'eau chaude sanitaire dans les établissements sociaux et médico-sociaux, les établissements pénitentiaires, les hôtels, les résidences de tourisme, les campings et les autres établissements recevant du public

Points de surveillance	Mesures obligatoires pour chacun des réseaux d'eau chaude sanitaire
Sortie de la/des production(s) d'eau chaude sanitaire (mise en distribution)	Température de l'eau : 1 fois par mois
Fond de ballon(s) de production et de stockage d'eau chaude sanitaire, le cas échéant	Analyses de légionelles : 1 fois par an - dans le dernier ballon si les ballons sont installés en série - dans l'un d'entre eux si les ballons sont installés en parallèle
Point(s) d'usage à risque le(s) plus représentatif(s) du réseau et point(s) d'usage le(s) plus éloigné(s) de la production d'eau chaude sanitaire	Analyses de légionelles : 1 fois par an Température de l'eau : 1 fois par mois
Retour de boucle (retour général), le cas échéant	Analyses de légionelles : 1 fois par an Température de l'eau : 1 fois par mois au niveau de chaque boucle

Dans le cas où les réseaux d'eau chaude sanitaire ne sont pas utilisés pendant plusieurs semaines, des prélèvements pour l'analyse de légionelles sont réalisés après la purge des réseaux et dans les deux semaines qui précèdent l'accueil du public. Les prélèvements sont programmés de telle sorte que les résultats d'analyses de légionelles soient connus du directeur de l'établissement avant l'accueil du public.

Le responsable des installations assure la traçabilité de cette surveillance. Il consigne les modalités et les résultats de cette surveillance avec les éléments descriptifs des réseaux d'eau chaude sanitaire et ceux relatifs à leur

maintenance dans un fichier sanitaire des installations, qui est tenu à disposition des autorités sanitaires.

La surveillance est renforcée par le responsable des installations en cas d'incident ou de dysfonctionnement sur le réseau d'eau chaude sanitaire de nature à favoriser la prolifération des légionelles. Elle est également renforcée par le responsable des installations à la demande du directeur général de l'agence régionale de santé, notamment lorsque la qualité de l'eau ne respecte pas les objectifs cibles définis en Legionella pneumophila ou lorsqu'un signalement de cas de légionellose est mis en relation avec l'usage de l'eau distribuée.

Maîtrise du risque de développement des légionelles

Le Guide technique du CSTB – Ministère de la santé "Maîtrise du risque de développement des légionelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire", paru en janvier 2012, rappelle les points-clés de

l'hydraulique des réseaux d'eau chaude sanitaire afin de maîtriser les débits et les températures dans l'objectif de limiter la prolifération des légionelles. Il propose des méthodologies d'autodiagnostic du fonctionnement des boucles d'eau chaude sanitaire : le constat température, le constat débit/perde de charge et l'autodiagnostic hydraulique

simplifié. Il donne également des préconisations pour la rédaction d'un cahier des charges de réhabilitation et de maintenance d'un réseau.

Afin de lutter efficacement contre la formation de biofilm, il est indispensable d'assurer un fonctionnement hydraulique satisfaisant dans les boucles d'eau chaude sanitaire et ainsi maintenir l'eau à une température élevée, supérieure à 50° C, en tout point de canalisations maintenues en circulation par la pompe, depuis la production jusqu'au piquage des antennes. Pour cela, le dimensionnement ne doit pas se baser uniquement sur le calcul des pertes thermiques. Le calcul des pertes de charge du réseau d'eau chaude sanitaire, le respect des vitesses de circulation dans les canalisations et des plages de fonctionnement des organes d'équilibrage sont tout aussi importants pour un bon dimensionnement des boucles d'eau chaude sanitaire.

La réalisation des actions de prévention limite, voire supprime la nécessité de réaliser des interventions curatives sur les réseaux d'eau chaude sanitaire qui ne garantissent pas une efficacité à long terme. De plus de tels traitements peuvent avoir pour conséquences un déséquilibre de la flore microbienne et une dégradation des installations (corrosion), favorisant ainsi la création de nouveaux gîtes favorables à la prolifération des légionelles.

Les établissements de santé

Le Guide technique de l'eau dans les établissements de santé, diffusé par la circulaire DHOS/DGS n°2005-417 du 9 septembre 2005, récapitule l'ensemble des obligations réglementaires relatives à l'eau dans les établissements de santé et donne des recommandations de bonnes pratiques.

Ce guide a pour objet :

- d'identifier les principaux dangers et risques sanitaires liés aux divers usages de l'eau ;
- de proposer des éléments d'organisation pour la gestion de ces risques, par la mise en place par les établissements d'une démarche globale de gestion de la qualité de l'eau ;
- de donner des recommandations sur la qualité de l'eau requise selon les différents usages (tableau 4-6) et de proposer un programme de surveillance de cette qualité ;
- d'identifier les principaux modes de défaillance dans la production et la distribution de l'eau ;

- de définir les règles générales de conception et de réalisation des installations de distribution d'eau ;
- de proposer un programme d'entretien et de maintenance de ces installations.

La circulaire DGS/DHOS n°2002-243 du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé préconisait de mettre en œuvre un plan d'action de prévention de la légionellose. Celui-ci comprend l'expertise des installations avec la mise en place d'un programme de surveillance (recherche des légionelles et mesure régulière de la température de l'eau chaude sanitaire), l'élaboration et le suivi du carnet sanitaire, la mise en place de protocoles de gestion dans le cas de présence de légionelles, de patients à haut risque et de cas de légionellose, la planification des travaux de réfection des réseaux, les protocoles de nettoyage et de désinfection des réseaux d'eau ainsi que les actions curatives à entreprendre lors du dépassement du niveau d'action en *Legionella pneumophila* (1 000 UFC/l). Le groupe Eau - Santé a publié trois ouvrages sur les "Eaux des établissements de santé" :

- qualité de l'eau des réseaux intérieurs (décembre 2000)
- qualité de l'eau aux points d'usage (mai 2003)
- lexique pratique (septembre 2006)

Le premier ouvrage présente les qualités d'eau froide et d'eau chaude des réseaux intérieurs ainsi que la qualité de l'eau des systèmes de traitement d'air ; il donne aussi quelques éléments de maîtrise des processus de traitement de l'eau et les démarches conduisant à l'élaboration du Système Qualité des réseaux.

Le deuxième ouvrage porte sur la qualité de l'eau aux points d'usage. Il traite de la qualité de l'eau aux points d'usage et des méthodes de prélèvements et d'analyse. Sont envisagés ensuite les divers usages de l'eau dans les établissements de santé : eaux en contact avec le patient (usage alimentaire, hygiène et soins des patients, hémodialyse et hémofiltration, oxygénothérapie et aérosolthérapie, unités dentaires et piscines médicales), eaux en contact avec le personnel soignant (lavage et désinfection des mains), eaux en contact avec les dispositifs médicaux (traitement des dispositifs médicaux, eaux alimentant les autoclaves). Il est ainsi précisé les définitions, les rappels réglementaires, la connaissance des risques, la qualité de l'eau exigée ou recommandée, les moyens d'obtention et de maintien de la qualité, le contrôle de la qualité et les actions correctives.

TABLEAU 4-6 : paramètres microbiologiques (niveaux cible) des différentes catégories d'eau des établissements de santé

Catégories d'eau	Flore aérobie révivifiable 22° C	Flore aérobie révivifiable 36° C	Coliformes totaux	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Endotoxines
Eau à usage alimentaire	100 UFC/ml	10 UFC/ml	< 1 UFC/100 ml	< 1 UFC/100 ml			
Eau pour soins standards	≤ 100 UFC/ml	≤ 10 UFC/ml	< 1 UFC/100 ml	< 1 UFC/100 ml			
Eau bactériologiquement maîtrisée	≤ 1 UFC/100 ml			≤ 1 UFC/100 ml	< 250* UFC/l Lp non détectées		
Eau chaude sanitaire					< 1 000 UFC/l		
Eau des piscines de rééducation		< 100 UFC/ml	≤ 1 UFC/ml	≤ 1 UFC/100 ml		≤ 1 UFC/100 ml	
Eau des bains à remous et douches à jets	< 100 UFC/ml	≤ 1 UFC/100 ml	≤ 1 UFC/100 ml	< 250 UFC/l Lp non détectées	≤ 1 UFC/100 ml		
Eau pour hémodialyse							
- hémodialyse conventionnelle		< 100 UFC/ml		< 1 UFC/ml			< 0,25 UI/ml
- hémodiafiltration en ligne	< 100 UFC/l						< 0,25 UI/ml

* Pour les patients à haut risque dans les établissements de santé, l'eau soutirée au niveau des points à risque doit viser en permanence l'absence de *Legionella pneumophila* (dénombrement de légionelles inférieur à 250 UFC/L et *Legionella pneumophila* non détectées)

➤ *L'innocuité de l'eau d'entrée doit être garantie vis-à-vis de la population de l'établissement mais aussi vis-à-vis des ouvrages de transport. Elle ne doit pas véhiculer de polluants à des doses toxiques ou de micro-organismes pathogènes ou opportunistes. Elle doit éviter la corrosion ou l'entartrage excessif des canalisations et permettre la diffusion du résiduel de désinfectant. Il est conseillé de surveiller chaque point d'alimentation en eau d'entrée. Une fréquence trimestrielle est conseillée.*

Pour l'eau à usage alimentaire, il est recommandé d'adopter une fréquence minimale d'un contrôle bactériologique par tranche de 100 lits et par an, avec un minimum de 4 contrôles par an pour l'ensemble de l'établissement de santé.

Pour l'eau pour soins standards, il est recommandé de réaliser un contrôle trimestriel sur les points d'usage considérés comme représentatifs de la qualité de l'eau distribuée.

Pour l'eau bactériologiquement maîtrisée (soins spécifiques), les contrôles doivent être effectués en fonction du système d'assurance qualité mis en place dans l'établissement (fréquence minimale

trimestrielle). Les systèmes de microfiltration à usage unique ne justifient pas de réaliser des contrôles bactériologiques dès lors que le procédé a été validé et que ses modalités d'utilisation sont régulièrement contrôlées.

Les contrôles de l'eau des piscines de rééducation et des bains à remous et des douches à jets doivent être réalisés mensuellement.

L'eau pour hémodialyse "classique" est contrôlée selon le nombre de séances de traitement par an (circulaire DGS/DH/AFSSAPS n° 2000/337 du 20 juin 2000 relative à la diffusion d'un guide pour la production d'eau pour hémodialyse des patients insuffisants rénaux)

L'eau pour l'hémodiafiltration "en ligne" est contrôlée une fois par mois au minimum (une fois par semaine pendant 1 mois au démarrage (circulaire DGS/DH/AFSSAPS n°311 du 7 juin 2000 relative aux spécifications techniques et à la sécurité sanitaire de la pratique de l'hémofiltration et de l'hémodiafiltration "en ligne" dans les établissements de santé).

Paramètres	< 200	200 à 1 000	1 000 à 10 000	> 10 000
Conductivité				
Calcium				
Nitrates				
Substances oxydables	1 fois/an	2 fois/an	4 fois/an	12 fois/an
Aluminium				
Microbiologie				
Endotoxines				

Les établissements pour personnes âgées

Les établissements sociaux et médico-sociaux d'hébergement pour personnes âgées doivent suivre les consignes mentionnées dans la circulaire DGS/DHOS/DGAS n° 2005-493 du 28 octobre relative à la prévention du risque lié aux légionelles. Les consignes sont proches de celles relatives

aux établissements de santé. Les plans d'action intègrent notamment la surveillance de la qualité de l'eau vis-à-vis des légionelles, l'expertise des installations de distribution d'eau et la définition, le cas échéant, des travaux de réfection.

Plusieurs facteurs contribuent à rendre les personnes âgées fragiles et donc vulnérables vis-à-vis de l'infection : le vieillissement des

tissus et organes, et particulièrement du système immunitaire, le cumul des pathologies chroniques et/ou dégénératives (insuffisance respiratoire, cardiaque,...), la dénutrition, la malnutrition et la déshydratation qui altèrent les défenses immunitaires, l'immobilité qui favorise la stase urinaire, colique et bronchique, les traitements médicamenteux liés aux diverses pathologies (sédatifs qui prédisposent aux infections pulmonaires et urinaires, antiacides aux infections digestives, antibiotiques et altération de la flore digestive,...).

Ainsi, d'une manière générale, les personnes âgées sont susceptibles de développer diverses infections dont certaines peuvent être d'origine hydrique : infections respiratoires (légiellose, mycobactériose), diarrhées et gastro-entérites, infections cutanées après colonisation de la peau ou immersion.

L'ouvrage du groupe Eau - Santé "*Eau des établissements pour personnes âgées - Maîtrise des risques sanitaires*", paru en mai 2008, présente les éléments indispensables à connaître sur les réseaux d'eau intérieurs (obligations réglementaires, recommandations d'actions courantes

et recommandations d'actions spécialisées, traitements de l'eau, protection des réseaux, fréquences d'entretien) et la gestion des installations à risque (brumisateurs, bains à remous, installations décoratives, humidificateurs, nettoyeurs à haute pression,...).

Les établissements thermaux

Les établissements thermaux doivent suivre les dispositions précisées dans l'arrêté du 19 juin 2000 relatif au contrôle des sources d'eaux minérales naturelles et dans la circulaire DGS n°2000-336 du 19 juin 2000 concernant la gestion du risque microbien.

Les établissements thermaux dispensent des soins utilisant l'eau minérale comme agent thérapeutique, à des patients dont les défenses parfois affaiblies peuvent les rendre vulnérables aux infections. Cette eau doit donc répondre aux caractéristiques particulières de qualité microbiologique et de sécurité exigées pour tout produit à usage thérapeutique. Les micro-organismes

TABLEAU 4-7 : critères de qualité microbiologique de l'eau minérale naturelle (valeurs impératives)

	Emergence	Points d'usage		
		(1)	(2)	(3)
Coliformes à 37° C dans 250 ml	Absence	Absence	Absence	Absence
Coliformes thermotolérants (<i>Escherichia coli</i>) à 44,5° C dans 250 ml	Absence	Absence	Absence	Absence
Streptocoques fécaux (entérocoques) dans 250 ml	Absence	Absence	Absence	Absence
Anaérobies sporulés sulfito-réducteurs dans 50 ml	Absence	Absence	Absence	Absence
<i>Legionella/ Legionella pneumophila</i> dans 1 litre	< Au seuil de la détection de la méthode	< Au seuil de la détection de la méthode	< Au seuil de la détection de la méthode	< Au seuil de la détection de la méthode
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans 250 ml	Absence	Absence	Absence	Absence

(1) Soins en contact direct avec les muqueuses respiratoires ou susceptibles de provoquer un contact avec les muqueuses oculaires et respiratoires.

(2) Soins en contact avec les autres muqueuses internes et ingestion d'eau minérale naturelle.

(3) Soins externes individuels (bains, douches) ou collectifs (couloir de marche).

revivifiables à 22° C et à 37° C ne doivent montrer aucune variation ou augmentation anormale (valeurs guides). Les autres micro-organismes recherchés ont des valeurs impératives (tableau 4-7).

A l'émergence et à la source, le contrôle microbiologique est effectué 4 fois par an, pour les établissements ouverts plus de 7 mois, dont un contrôle avant l'ouverture, et 3 fois par an, pour ceux ouverts moins de 7 mois, dont un contrôle avant l'ouverture.

La fréquence des analyses aux points d'usage est différente selon le type de soins effectués :

- pour les soins en contact direct avec les muqueuses respiratoires ou susceptibles de provoquer un contact avec les muqueuses oculaires et respiratoires, une analyse microbiologique mensuelle (type BMO), avec recherche de *Legionella* (BM1) est demandée.
- pour les soins en contact avec les autres muqueuses internes, l'ingestion d'eau minérale, et pour les soins externes individuels ou collectifs, une analyse microbiologique mensuelle (BMO) et la recherche de *Legionella* (BM1) au moins trimestrielle.

Si, après un an de surveillance, aucune contamination microbiologique de l'eau n'est mise en évidence pour les paramètres *Escherichia coli* et autres coliformes, *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella sp.*, le nombre des contrôles aux points d'usage pourra être diminué, sans toutefois être inférieur à un par trimestre.

4.2 La sécurité sanitaire de l'eau dans les bâtiments (OMS)

Les directives présentées dans ce document de l'Organisation Mondiale de la Santé, paru en juillet 2011, portent sur la gestion de l'approvisionnement en eau dans les bâtiments, comportant des équipements publics ou collectifs, où l'eau est destinée à des usages tels que la boisson, la préparation des aliments, la lessive, la toilette, la baignade (ou d'autres activités récréatives), mais aussi où des personnes peuvent être exposés à des aérosols produits par des dispositifs utilisant de l'eau (comme les tours aéroréfrigérantes). Ces usages se rencontrent dans les immeubles

➤ Afin de limiter les développements microbiens et les risques sanitaires et de respecter les exigences de qualité de l'eau distribuée par les réseaux intérieurs, il est nécessaire :

- d'assurer une circulation équilibrée de l'eau, en évitant la faible circulation ou la stagnation de l'eau provoquée par les bras morts du réseau, les bouclages, les réservoirs ou les équipements terminaux et en favorisant l'utilisation régulière de l'eau aux points d'usage ;
- de lutter contre l'entartrage et la corrosion par une conception et un entretien régulier, adaptés à la qualité de l'eau et aux caractéristiques de l'installation ;
- d'avoir une bonne gestion de la température de l'eau dans les réseaux d'eau chaude et d'eau froide sanitaires.

Ces procédures et les informations recueillies doivent être formalisées et tenues à jour dans un carnet sanitaire des installations (circulaire du DGS/DHOS n°2002-243 du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé).

Le carnet sanitaire des installations de distribution d'eau est un système documentaire, véritable "outil de gestion", qui apporte les preuves que les dispositions prévues sont mises en œuvre et qu'elles sont efficaces. Il regroupe l'ensemble des informations existantes qui concernent la conduite, la surveillance, l'entretien ou maintenance de routine, la maintenance préventive et les réparations des installations d'eau froide et d'eau chaude sanitaire.

Il comprend différents volets qui doivent être régulièrement tenus à jour :

- renseignement relatifs à l'organisation, aux intervenants, aux responsabilités des personnes concernées : entreprises intervenantes,...
- documents de présentation des installations de distribution d'eau :
 - schéma descriptif actualisé du réseau : circuits, systèmes de protection, points d'injection de produit, points de prélèvement, points de purges,...
 - caractéristiques principales : matériaux constitutifs des canalisations, état des canalisations, système de production d'eau chaude, appareils de traitement d'eau,...
 - travaux de modification, de rénovation ou d'extension des installations de distribution d'eau.
- liste des différents postes utilisateurs d'eau dans l'établissement, classés par type d'usage (alimentaire, sanitaire, soins, technique,...)
- procédures et protocoles concernant :
 - la maintenance et l'entretien des installations : nature, fréquence
 - la surveillance des installations (modalités de prélèvement, niveaux d'intervention, à respecter pour la qualité de l'eau),
 - les consignes d'intervention (mesures curatives), en cas de dépassement,
 - la stérilisation ou le remplacement des filtres terminaux et des pré-filtres,
 - la vérification des ensembles de protection.
- le journal d'intervention comprenant :
 - le registre des interventions effectuées : fiche d'entretien (nature de l'intervention, date, intervenant, commentaire), fiche de traitement
 - le relevé des consommations d'eau
 - le relevé de températures de l'eau froide et de l'eau chaude
 - le relevé des prélèvements et des analyses d'eau
- le programme d'amélioration des installations de distribution d'eau, avec échéancier

les plus divers : hôpitaux, écoles, crèches et jardins d'enfants, résidences pour personnes âgées, centres médicaux et dentaires, hôtels, immeubles d'habitation, centres sportifs, immeubles à usage commercial, terminaux de transport.

Les directives formulées dans ce document se fondent sur le cadre fourni par les *Directives de qualité pour l'eau de boisson* (OMS, 2008), ainsi que sur les documents supports traitant des aspects suivants :

- *Guidelines for safe recreational water environments volume 2 : swimming pools and similar environments* (WHO, 2006a) ;
- *Health aspects of plumbing* (OMS/WPC, 2006) ;

- *Heterotrophic plate counts and drinking-water safety : the significance of HPCs for water quality and human health* (Bartram et al., 2003) ;
- *Legionella and the prevention of legionellosis* (Bartram et al., 2007) ;
- *Pathogenic mycobacteria in water : a guide to public health consequences, monitoring and management* (Bartram et al., 2004).

Une gestion inappropriée de l'eau dans les bâtiments peut avoir des effets considérables sur la santé, et d'importantes répercussions économiques et sociales directes et indirectes. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a établi que les bénéfices liés aux diverses interventions visant à réduire les risques sanitaires liés à l'eau dépassaient largement les coûts correspondants (Hutton & Haller, 2004). Dans les établissements de soins, les coûts des infections nosocomiales, y compris celles qui sont transmises par l'eau, sont extrêmement élevées, et sont en augmentation - qu'il s'agisse des coûts directs ou des conséquences pour la réputation des établissements (Anaissie et al., 2002). Les voyages et les séjours à l'hôtel sont reconnus comme facteurs de risque de légionellose (Bartram et al., 2007). En Europe, près de 20 % des cas de légionellose détectés sont considérés comme liés aux voyages (Joseph, 2002 ; Bartram et al., 2007). Certains cas de légionellose dans des hôtels ont fait l'objet d'une publicité aux conséquences économiques désastreuses pour les établissements concernés.

Les directives du présent document sont fondées sur le *Cadre destiné à garantir la salubrité de l'eau de boisson, tiré des Directives de qualité pour l'eau de boisson* (OMS, 2008). Il comprend les éléments suivants :

- fixer des objectifs d'ordre sanitaire, comme "normes de référence" pour la définition de la sécurité sanitaire de l'eau de boisson ;
- assurer la sécurité par l'élaboration et la mise en œuvre d'un *Plan de gestion de la sécurité sanitaire de l'eau* (PGSSE) permettant l'évaluation et la gestion systématiques des risques ;
- établir un système de surveillance indépendant, pour vérifier que les PGSSE fonctionnent efficacement et assurent la fourniture d'eau conforme en permanence aux objectifs d'ordre sanitaire.

Les PGSSE sont le moyen le plus efficace d'assurer de façon cohérente la sécurité de l'approvisionnement en eau de boisson, par une démarche globale de gestion des risques couvrant toutes les étapes, de la source à la distribution aux consommateurs en passant par le traitement. Les



Les directives de qualité de l'eau de boisson comportent quatre sections :

- la section 2 est constituée de brefs textes introductifs exposant les principaux problèmes liés à la sécurité sanitaire de l'eau dans les bâtiments. Elle est organisée en sous-sections traitant des dangers et des risques, des usagers des bâtiments et différents types de bâtiments.
- la section 3 traite du rôle et des responsabilités des parties prenantes influant sur la sécurité sanitaire des réseaux d'eau dans les bâtiments. Les parties prenantes peuvent être impliquées dans la planification, la conception, la construction et la rénovation des bâtiments, dans l'élaboration de Plans de gestion de la sécurité sanitaire de l'eau (PGSSE) et dans la maintenance et l'exploitation courantes des réseaux d'eau.
- la section 4 décrit les étapes de l'élaboration et de la mise en œuvre des PGSSE, et fournit des exemples de la façon dont ces principes clés peuvent être appliqués aux bâtiments. Cette section est organisée en sous-sections expliquant comment constituer les équipes ; comprendre un réseau d'eau ; identifier les dangers et évaluer les risques ; mettre en place les mesures de maîtrise des risques, la surveillance opérationnelle et les procédures de gestion, et établir les programmes de vérification et d'appui.
- la section 5 est consacrée aux dispositifs d'appui qui, bien que n'affectant pas directement la qualité de l'eau, favorisent la fourniture d'eau sans risque sanitaire. Cette section est organisée en sous-sections traitant des modalités d'inspection et de surveillance techniques indépendantes, de la surveillance des maladies et de la détection des flambées de maladies, des cadres réglementaire et politique, ainsi que du développement des capacités et de la formation.

Le Plan de gestion de la sécurité sanitaire de l'eau (PGSSE) des bâtiments : les points clés

► *Le Plan de gestion de la sécurité sanitaire de l'eau (PGSSE) des bâtiments : les points clés*

1. Constitution de l'équipe PGSSE

2. Description du réseau d'eau

- fonctions des réseaux d'eau à l'intérieur des bâtiments
- usages et modes d'utilisation de l'eau

Comprendre et décrire la conception du réseau d'eau

Les éléments suivants, notamment, doivent être examinés et consignés :

- point(s) d'entrée dans le bâtiment, y compris les traitements éventuels aux points d'entrée ;
- éventuelles sources d'eau propres au bâtiment, et traitements associés ;
- canalisations, systèmes de stockage et connexions entre réseau d'eau potable et non potable, notamment connexions intentionnelles (entre réseaux d'eau de boisson et réseaux de lutte contre l'incendie, par exemple) et non intentionnelles (entre réseaux d'eau de boisson et réseaux d'eaux usées ou recyclées, par exemple) ;
- dispositifs de chauffage et de fourniture d'eau chaude ;
- réseaux de distribution d'eau chaude ;
- équipements installés aux points d'utilisation (lave-vaisselle, lave-linge, fontaines d'eau de boisson, par exemple) ;
- systèmes de traitement de l'eau aux points d'utilisation.

3. Identification des dangers et événements dangereux

- dangers microbiens
- dangers chimiques

4. Événements dangereux

- approvisionnement en eau contaminé ou intermittent
- pénétration d'une contamination
- gestion déficiente des mesures de traitement de l'eau
- prolifération microbienne et biofilms
- dangers provenant de matériaux et d'équipements
- utilisations spécifiques de l'eau
- défauts de gestion (utilisation intermittente)
- travaux de construction, rénovations et réparations
- situations d'urgence conduisant à une contamination de l'approvisionnement externe

5. Évaluation des risques

- nombre de personnes exposées, leur vulnérabilité et type d'exposition
- informations à prendre en compte (figure 4-1)
- matrice d'estimation et de classement des risques (tableaux 4-8 et 4-9)

6. Mesures de maîtrise des risques

- mesures préventives : intégrées à la conception, à la planification, à la construction et à la réception de l'installation ;

- mesures de traitement : filtration, désinfection, adoucissement, par exemple ;
- mesures techniques régulation de la température, procédures de maintenance, par exemple ;
- mesures touchant aux comportements : mesures influant sur le mode d'utilisation de l'eau, notamment.

7. Surveillance opérationnelle des mesures de maîtrise des risques

- sur quels points doit porter la surveillance ?
- comment est réalisée la surveillance ?
- où intervient la surveillance ?
- quand et à quelle fréquence ?
- qui assure la surveillance ?
- qui doit recevoir les résultats pour les analyser et veiller, s'il y a lieu, à la mise en œuvre de réponses appropriées ?

8. Procédures de gestion et actions correctives

9. Procédures de gestion dans le cas de bâtiments neufs ou d'importants travaux de modernisation

10. Vérifications

- tests de qualité d'eau
- audits des plans de gestion de la sécurité sanitaire de l'eau

11. Programmes d'appui

12. Revues périodiques

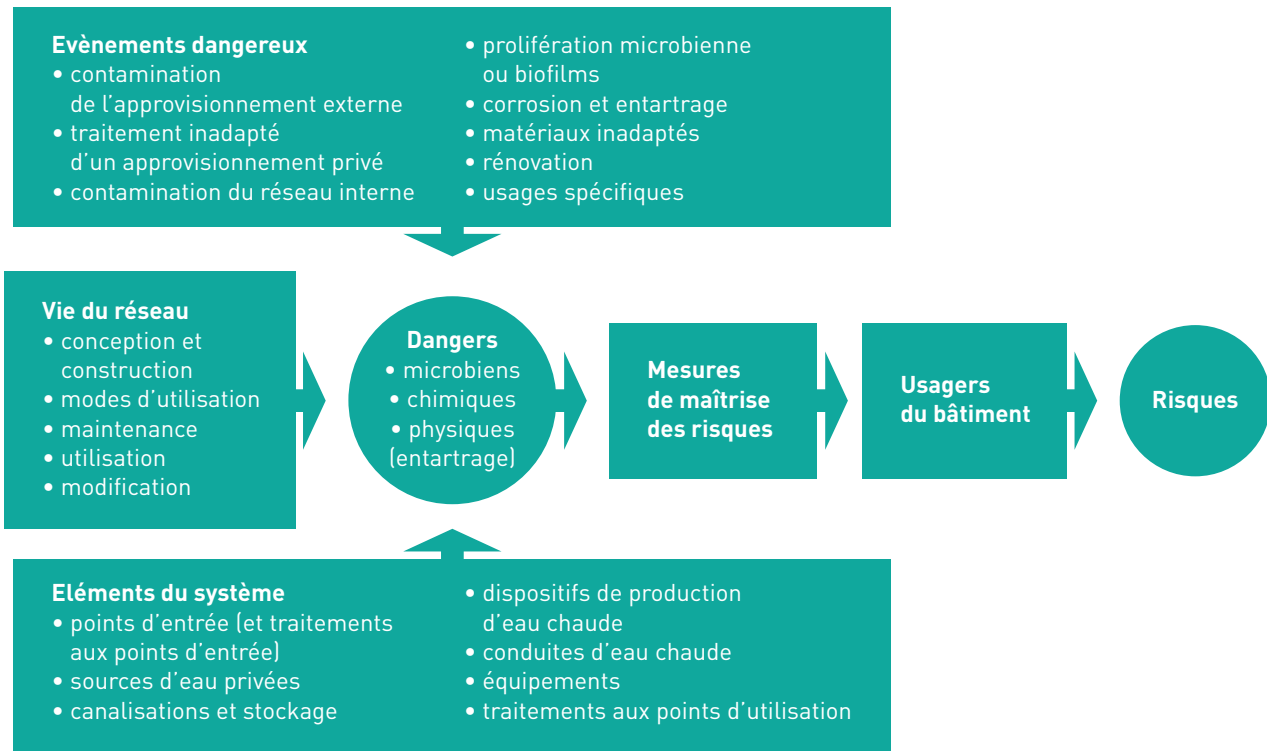


Figure 4-1 : types d'information à prendre en compte dans l'évaluation des risques

TABLEAU 4-8 : exemple simple de matrice d'estimation et de classement des risques

Probabilité	Gravité des conséquences				
	Insignifiantes	Mineures	Modérées	Majeures	Catastrophiques
Presque certain					
Probable					
Modérément probable					
Improbable					
Rare					

TABLEAU 4-9 : exemples de définitions des niveaux de probabilité et de gravité des conséquences applicables pour l'estimation des risques

Item	Définition
Niveaux de probabilité	
Presque certain	Une fois par jour
Probable	Une fois par semaine
Modérément probable	Une fois par mois
Improbable	Une fois par an
Rare	Une fois tous les cinq ans
Niveaux de gravité	
Catastrophique	Potentiellement létal pour tous les usagers du bâtiment, groupes vulnérables compris (patients immunodéprimés, nourrissons et personnes âgées, par exemple) en cas d'exposition aiguë
Majeure	Potentiellement nocif pour tous les usagers du bâtiment en cas d'exposition aiguë
Modérée	Potentiellement nocif pour les groupes vulnérables (patients immunodéprimés, nourrissons et personnes âgées, par exemple) en cas d'exposition chronique
Mineure	Potentiellement nocif pour tous les usagers du bâtiment en cas d'exposition Chronique
Insignifiante	Impact nul ou non détectable

PGSSE destinés aux bâtiments doivent couvrir à la fois les réseaux d'eau de boisson et les dispositifs et équipements connectés à ces réseaux. Fondée sur l'identification de tous les risques significatifs pour la santé publique, la démarche PGSSE assure la mise en place de mesures de maîtrise des risques et des barrières efficaces pour réduire ces risques à un niveau acceptable, et vérifie que ces mesures et barrières sont opérationnelles et que la sécurité est préservée.

L'élaboration et la mise en œuvre de PGSSE peut être du ressort de différentes parties prenantes : alors que les PGSSE applicables au traitement et à la distribution publics d'eau sont classiquement du ressort des producteurs et distributeurs d'eau, les PGSSE des bâtiments relèvent de la respon-

sabilité des propriétaires et gérants des bâtiments, avec le soutien de diverses autres parties prenantes.

Les PGSSE sont généralement élaborés après la conception et la construction des réseaux d'approvisionnement en eau. Cependant, lorsque c'est possible, les réseaux neufs ou rénovés devraient être conçus et réalisés de façon à favoriser la mise en œuvre des PGSSE. Quel que soit le moment où ils sont élaborés, les PGSSE doivent être des documents de travail, qu'il convient de mettre à jour et de réviser périodiquement pour qu'ils restent actuels. Les PGSSE doivent être révisés en cas de changements importants dans l'approvisionnement en eau ou dans les usages de l'eau.

Les procédés et produits de traitement de la contamination des réseaux intérieurs peuvent être distingués en deux catégories :

- les procédés et produits utilisés pour le nettoyage (lutte contre les dépôts et incrustations) et la désinfection des installations de distribution d'eau. Ils correspondent à un *traitement choc* du réseau, mis hors service. Ces opérations peuvent également être suivies d'un traitement de protection, si l'état du réseau le nécessite (lutte contre le tartre et la corrosion).
- les procédés et produits de traitement de l'eau appliqués, dans un réseau en service, pour un traitement complémentaire de l'eau distribuée.

fait de leur constitution, nuisant à l'action des désinfectants.

- des matériaux constitutifs des installations. Il faut savoir qu'il est fondamental d'étudier la compatibilité entre ces matériaux et les produits utilisés.
- des méthodes de nettoyage et de désinfection utilisées (physiques, chimiques).
- des micro-organismes à atteindre.
- de la température de l'eau.

Ces différents paramètres interférant entre eux, l'effet de la désinfection dans un réseau peut être limité. Il est nécessaire, dans tous les cas, d'établir un protocole précis des modalités de traitement de l'eau ou des réseaux, voire de tester l'efficacité de divers protocoles.

- *les traitements de nettoyage et de désinfection ne sont efficaces que dans les réseaux où l'eau circule correctement.*
- *le traitement de désinfection est d'autant plus efficace qu'un nettoyage a été effectué au préalable.*
- *la maîtrise de la température en tout point du réseau en circulation peut permettre de s'affranchir de tout traitement de désinfection.*
- *les interventions curatives ne garantissent pas une efficacité à long terme.*
- *les traitements peuvent avoir des conséquences néfastes sur le réseau, c'est-à-dire en créant un déséquilibre de l'écosystème microbien avec l'émergence de micro-organismes particuliers et en dégradant les matériaux des installations (corrosion), favorisant aussi de nouveaux gîtes de développement microbien.*

L'efficacité des différents procédés et produits de traitement dépend de nombreux paramètres. La technique ainsi que le choix des procédés et des produits doivent donc être adaptés au cas par cas, notamment en fonction :

- de l'état général et de la conception du réseau de distribution. Il faut savoir que les traitements mis en œuvre sont d'autant plus efficaces et faciles à réaliser si le réseau a été bien conçu à l'origine ;
- de l'état et de la composition des dépôts dans les installations. Il faut savoir que les biofilms et/ou les dépôts de produits de corrosion, du

5.1 Les procédés et produits de nettoyage et de désinfection

Les procédés et produits de nettoyage et de désinfection des installations de distribution d'eau ne concernent qu'un réseau mis hors service, subissant un *traitement choc*, en système fermé. Un réseau est mis hors service lorsqu'il n'assure pas sa fonction de distribution d'eau : pendant les opérations de traitement, l'eau ne doit pas être mise à la disposition des usagers.

Il est donc nécessaire, avant toute décision, de s'assurer de la faisabilité du *traitement choc*.

La partie du réseau ou de l'installation que l'on souhaite nettoyer et désinfecter doit être correctement isolée et il est nécessaire de respecter les dispositions de rinçage avant réutilisation.

Ces actions *dites curatives* peuvent être rendues nécessaires par la mise en évidence, dans l'eau, de micro-organismes en concentrations excessives ou bien lors de la survenue de cas d'infections dont l'origine peut être associée à une contamination de l'eau distribuée.

Le traitement curatif consiste à mettre en œuvre, après nettoyage, une désinfection "choc" ponctuelle destinée à diminuer, de manière très significa-

tive, la concentration des micro-organismes en suspension dans l'eau et de ceux fixés dans les biofilms. Toutefois, ces actions curatives ne peuvent qu'être exceptionnelles et de courte durée, car, en l'absence de mesures préventives générales (relatives à la conception, la maintenance, la température de l'eau, ...), le réseau se colonisera à nouveau en quelques semaines.

Traitements de nettoyage des installations d'eau

Les traitements de nettoyage sont utilisés soit pour ôter les dépôts et les incrustations soit pour retirer une partie de biofilm. Le nettoyage chimique consiste à introduire dans la canalisation un mélange de produits chimiques permettant la dissolution des différents dépôts. Ces derniers sont en général constitués de carbonates de calcium et/ou d'hydroxydes de fer.

Les mélanges utilisés sont constitués d'un acide (acide chlorhydrique ou acide sulfamique par exemple), de réducteurs et d'un inhibiteur de corrosion (acide phosphorique par exemple).

Les produits et procédés mis sur le marché et destinés au traitement de l'eau destinée à la consommation humaine doivent, dans les conditions normales ou prévisibles de leur emploi, être conformes à des dispositions spécifiques définies par arrêté du ministre chargé de la santé (article R.1321-50 du code de la santé publique).

L'arrêté du 8 septembre 1999, pris pour l'application de l'article 11 du décret n°73-138 du 12 février 1973 modifié, liste les constituants autorisés dans les produits de nettoyage des matériaux et objets destinés à être mis en contact des denrées alimentaires. Des produits ont aussi fait l'objet d'autorisation individuelle par le ministère chargé de la santé.

Le tableau 5-1 présente la liste des produits chimiques de nettoyage autorisés ainsi que leur compatibilité avec les matériaux constitutifs des installations d'eau.

Traitements de désinfection des installations d'eau

Les méthodes de traitement sont de trois types : chimiques et thermiques. Le tableau 5-2 présente la liste des produits et procédés autorisés en France pour la *désinfection choc curative* des

réseaux intérieurs de distribution ainsi que les doses employées et les temps de contact. Les concentrations de désinfectants sont données à titre indicatif et il faut s'assurer au préalable de la tenue des matériaux avec les types et les doses de désinfectants utilisés.

Les traitements chimiques

Plusieurs agents oxydants sont utilisés pour la *désinfection choc curative* sur un réseau mis hors service. Toutefois, ce type de traitement peut ne pas présenter une efficacité satisfaisante du fait d'une pénétration insuffisante des produits chimiques dans le biofilm (DeBeer *et al.*, 1994) ou dans les dépôts de produits de corrosion et de leur efficacité limitée vis-à-vis des protozoaires - amibes libres renfermant les micro-organismes

➤ *L'effet des produits sur les matériaux doit faire l'objet d'une attention particulière :*

- *les produits de nettoyage sont des produits à caractère acide, qui permettent le détartrage et la désoxydation des installations. Ce sont des produits à action très rapide (de 1 heure à 10 heures). Compte tenu de leur agressivité, l'emploi de formulations contenant des inhibiteurs de corrosion est souhaitable.*
- *la température d'utilisation des produits acides doit être limitée à 50° C en raison des effets sur les matériaux.*
- *l'acier galvanisé ne résiste pas aux traitements avec des produits acides, et, le cas échéant, un traitement de protection doit être envisagé après emploi.*
- *les produits chimiques disponibles, utilisés pour le nettoyage des conduites en acier galvanisé, ne permettent pas d'éliminer la totalité des produits de corrosion. Ceux-ci, même après un rinçage prolongé, peuvent adsorber les composés organiques (acides notamment) ou les inhibiteurs tels que les phosphates qui sont susceptibles ensuite de favoriser les développements microbiens.*

Les mélanges de produits chlorés et de produits acides sont à proscrire en raison du risque d'intoxication par dégagement de chlore gazeux.

TABLEAU 5-1 : produits de nettoyage et compatibilité avec les matériaux constitutifs des installations d'eau (selon le Guide technique de l'eau dans les établissements de santé – 2005)

Matériaux constitutifs des installations d'eau	Produits acides de nettoyage				Produits alcalins de neutralisation ou de passivation					
	Acide chlorhydrique passivé à l'acide phosphorique ⁽¹⁾	Acide nitrique	Acide citrique ou acide ascorbique mélangé à ⁽¹⁾	Acide sulfamique	Hydroxyde de sodium	Hydroxyde de potassium	Carbonate de sodium	Poly-Phosphates alcalins	Ortho phosphates alcalins	Silicates de sodium et de potassium
Ballons										
Résine Organique	?	?	?	0	?	?	0	0	0	0
Mortier ciment adjuvanté	N	N	N	N	0	0	0	0	0	0
Email	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acier galvanisé	0	N	0	0	N	N	0	0	0	0
Conduites										
Acier galvanisé	0	N	0	0	N	N	0	0	0	0
Cuivre	0	N	0	0	0	0	0	0	0	0
Poly-éthylène réticulé	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C-PVC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Echangeur										
Etain	0	N	0	0	0	0	0	0	0	0
Nickel	N	N	N	0	0	0	0	0	0	0
Cuivre	0	N	0	0	0	0	0	0	0	0
Inox	N	0	N	0	0	0	0	0	0	0
Raccord Robinetterie										
Bronze	M	N	M	0	0	0	0	0	0	0
Laiton	M	N	M	0	N	N	0	0	0	0
Nickel-Chrome	M	0	M	0	0	0	0	0	0	0
Elastomère (joints)	0	0	0	0	?	?	0	0	0	0

0 = compatible
M = mauvais comportement aux chocs répétés
N = incompatibilité
? = la compatibilité est fonction du produit et doit être fournie par le fabricant

(cas notamment des légionelles) (Kilvington et Price, 1990 ; Thomas *et al.*, 2004) . Il peut aussi entraîner une augmentation de la corrosion des réseaux, créant ainsi de nouvelles zones de protection et de colonisation pour les micro-organismes (Kim *et al.*, 2002).

Compte tenu de son caractère ponctuel, ce type de traitement n'a pas d'effet rémanent. Afin d'obtenir un bon résultat, il peut être nécessaire de répéter ce traitement plusieurs fois, voire d'associer un traitement thermique au traitement chimique (cas par exemple, du *Pseudomonas aeruginosa*).

Après un temps de contact variant en fonction de la nature du produit chimique et de la concentration injectée, le réseau est alors vidangé et rincé avec de l'eau du réseau public, jusqu'à disparition de toute trace de la solution désinfectante. Le réseau remis en service doit délivrer une eau conforme aux critères de potabilité.

Le traitement thermique

Le traitement thermique utilisé pour la *désinfection choc curative* sur un réseau mis hors service consiste à faire circuler de l'eau à une température de 70° C environ pendant 30 minutes dans l'ensemble des réseaux intérieurs de distribution d'eau. Cette opération est suivie d'une vidange et d'un rinçage soigneux des canalisations avec de l'eau du réseau public.

- *la désignation des produits chimiques dans les listes proposées n'implique pas la garantie de résultat du procédé de traitement. Les résultats, en particulier sur l'abatement des légionelles, sont notamment liés :*
 - *aux conditions d'emploi (dilution, composition de la préparation commerciale, mélanges de différents constituants de cette liste,...)*
 - *aux caractéristiques physico-chimiques de l'eau.*
- *tout produit de désinfection utilisé dans les réseaux intérieurs de distribution d'eau destinée à la consommation humaine doit, dans les conditions normales ou prévisibles de son emploi, être conforme aux dispositions spécifiques de l'article R.1321-50 du code de la santé publique ou avoir fait l'objet d'une autorisation du ministère de la santé.*
- *à la suite des traitements réalisés sur des réseaux hors service, le réseau remis en service doit délivrer une eau conforme aux critères de potabilité (articles R.1321-1 à R.1321-5 du code de la santé publique).*

TABLEAU 5-2 : produits et procédés de désinfection utilisables pour le traitement choc curatif des réseaux intérieurs de distribution hors service (selon le Guide technique de l'eau dans les établissements de santé - 2005)

Produits

Composés chlorés générant des hypochlorites (hypochlorite de sodium ou de calcium, chlore gazeux, hypochlorite de calcium)	100 mg/l de chlore libre pendant 1 heure ou 50 mg/l de chlore libre pendant 12 heures ou 15 mg/l de chlore libre pendant 24 heures
Dichloro-isocyanurates (de sodium ou de sodium hydratés)	100 mg/l en équivalent de chlore libre pendant 1 heure ou 50 mg/l en équivalent de chlore libre pendant 12 heures ou 15 mg/l en équivalent de chlore libre pendant 24 heures
Peroxyde d'hydrogène mélangé avec de l'argent*	100 à 1 000 mg/l de peroxyde d'hydrogène**
Acide peracétique en mélange avec du peroxyde d'hydrogène	1 000 ppm en équivalent de peroxyde d'hydrogène pendant 2 heures
Soude	pH supérieur à 12 pendant au moins une heure***

Procédés

Choc thermique	70°C pendant au moins 30 minutes
----------------	----------------------------------

* il est nécessaire de vérifier que le stabilisant à base d'argent est un produit autorisé par le ministère de la santé

** pour un temps de contact en fonction de la concentration en désinfectant et pouvant aller jusqu'à 12 heures

*** cependant des précautions doivent être prises pour la tenue des matériaux. Cette solution doit être envisagée en dernier ressort et avec de grandes précautions eu égard au risque encouru par le personnel. Les produits doivent être neutralisés avant rejet dans les égouts.

- l'acier galvanisé n'est plus protégé de la corrosion dès que la température de l'eau est supérieure à 60° C : à cette température, les produits de corrosion du zinc qui ont réagi avec l'eau et ses constituants sont solubles et ne procurent pas la protection constatée à une température inférieure à 60°C. Le DTU 60-1 précise que les chocs thermiques sont interdits pour les tubes en acier galvanisé.
- le domaine d'emploi des canalisations et raccords en matériaux de synthèse doit être vérifié avant de réaliser un choc thermique.
- le choc thermique a un effet mécanique sur les surfaces internes des canalisations et induit une mise en suspension des particules qui peuvent provoquer le colmatage des organes de réglage.
- les capacités thermiques des installations de production et de distribution d'eau chaude sanitaire ne permettent pas toujours d'atteindre les 70° C aux points les plus éloignés de la production.
- ce type de traitement thermique nécessite de déployer d'importantes mesures de protection pour éviter les brûlures pendant sa réalisation (tableau 5-3) : affichage aux points d'usage, personnel présent aux points de puisage,...
- ce traitement de désinfection choc doit être réalisé de manière exceptionnelle, dans l'attente de la mise en œuvre de solutions pérennes permettant notamment la maîtrise des débits de circulation d'eau dans le réseau et le respect des consignes de températures de l'eau distribuée.

Cependant, les chocs thermiques n'ont qu'une efficacité transitoire vis-à-vis de la contamination microbienne (Kim *et al.*, 2002 ; Farhat *et al.*, 2010). Moutchouri *et al.* (2007) ont montré que les chocs thermiques dans des réseaux d'eau chaude sanitaire pouvaient n'être pas suffisamment efficaces pour éliminer complètement les légionelles à moins qu'ils ne soient appliqués très régulièrement et associés à un traitement chloré. Thomas *et al.* (2004) ont constaté que les amibes libres résistent à des températures de 70° C et représentent alors des refuges pour les légionelles. Par ailleurs, le choc thermique peut ne conduire qu'à un stress et non une destruction des bactéries ; celles-ci pouvant se retrouver dans les antennes et les bras morts et se développer de nouveau dans des conditions favorables.

Traitements de protection

Le traitement de nettoyage et de désinfection des réseaux d'eau, mis hors service, peut être suivi d'un traitement de protection si l'état du réseau le nécessite. Le tableau 5-4 présente la liste des produits utilisables.

Ces procédés et produits de traitement de l'eau doivent figurer dans les circulaires n°2000/166 du 28 mars 2000 et du 7 mai 1990 (annexe 3) relatives aux produits et procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine ou bénéficier d'une autorisation du ministre chargé de la santé, prise après avis de l'Anses (articles R.1321-48 et R.1321-55 du code de la santé publique).

TABLEAU 5-3 : correspondance entre la résistance thermique des légionelles et le risque de brûlure de la peau

Température de l'eau	Temps d'exposition	
	Brûlure profonde de la peau*	Destruction des légionelles
70° C	1 seconde	1 minute
60° C	7 secondes	30 minutes
50° C	8 minutes	Croissance stoppée

* pour une personne adulte en bonne santé (valeurs publiées par la Société française d'étude et de traitement des brûlures - 1992).
Le risque est plus important pour des personnes fragiles et les jeunes enfants.

- ce traitement de désinfection choc doit être réalisé de manière exceptionnelle, dans l'attente de la mise en œuvre de solutions pérennes permettant notamment la maîtrise des débits de circulation d'eau dans le réseau et le respect des consignes de températures de l'eau distribuée.

TABLEAU 5-4 : produits de protection utilisés pour les réseaux d'eau chaude sanitaire en service

Produits de protection anticorrosion et antitartre pour les réseaux d'eau chaude sanitaire en service

Produits actifs

Polyphosphates alcalins
 Orthophosphates
 Silicates de sodium
 Silicates de calcium
 Sulfates ou chlorures de zinc
 Aluminium par anode soluble*
 Magnésium par anode soluble*

Mélanges de produits

Les mélanges de polyphosphates alcalins, d'orthophosphates, de silicates de sodium et d'hydroxyde de sodium sont autorisés, tout ou partie.

Les doses injectées doivent être compatibles avec la réglementation des eaux destinées à la consommation humaine en vigueur et notamment pour les éléments chimiques suivants :

- sulfates : 250 mg/l exprimé en SO_4
- sodium : 200 mg/l exprimé en Na
- aluminium : 0,5 mg/l exprimé en Al

Il est recommandé que les doses injectées respectent les valeurs suivantes :

- silice : 10 mg/l exprimé en SiO_2
- zinc exprimé en Zn
- phosphates : 5 mg/l exprimé en P_2O_5

Il est important de tenir compte de la qualité de l'eau du réseau public.

* la mise en œuvre d'un traitement de protection par anode soluble (aluminium ou magnésium) nécessite une surveillance particulière en raison de la formation possible de nitrites (réduction des nitrates) et de l'émission dans l'eau d'une quantité d'aluminium excessive (cas des anodes en aluminium). Les boues d'alumine formées dans les ballons peuvent être le siège de développements biologiques et notamment de légionelles. Il convient donc de pratiquer très régulièrement des chasses en fond de ballon permettant d'éliminer ces dépôts.

Legionella pneumophila dans un réseau d'eau chaude sanitaire : quand engager les actions curatives ?

► La circulaire DGS du 21 décembre 2010 relative aux missions des Agences régionales de santé dans la mise en œuvre de l'arrêté du 1^{er} février 2010 apporte des informations aux maîtres d'ouvrage sur les actions curatives qui peuvent être engagées lorsque les objectifs cibles sont dépassés, c'est-à-dire une quantité de *Legionella pneumophila* supérieure à 1 000 UFC/l d'eau aux points d'usage à risque (douches et douchettes notamment) et supérieure au seuil de détection au niveau des points d'usage à risque accessible aux patients particulièrement vulnérables au risque de légionellose.

Dans un établissement de santé, les interventions à mettre en œuvre par le responsable des installations à la suite du dépassement des objectifs cible sont celles mentionnées dans le guide technique de l'eau dans les établissements de santé - 2005.

Actions préconisées en fonction des concentrations en *Legionella pneumophila* dans l'eau des installations de distribution aux points d'usage dans les établissements de santé

L'objectif cible est de maintenir la concentration en *Legionella pneumophila* à un niveau inférieur à 1 000 UFC/l d'eau par :

- Un entretien régulier des réseaux et des équipements
- Une surveillance régulière des paramètres physiques (température de l'eau,...) et microbiologiques

Le fait d'atteindre 1 000 UFC/l en *Legionella pneumophila* doit déclencher l'alerte et la mise en place progressive des mesures suivantes :

1) Mesures de base

S'assurer que l'information est adressée sans délai à l'ensemble des personnels en charge de la gestion de l'eau, du Comité de lutte contre les infections nosocomiales, de l'équipe opérationnelle d'hygiène et des services concernés

Comprendre l'origine des écarts avec les résultats des analyses antérieures et rechercher les causes de la prolifération

Evaluer l'étendue de la contamination du réseau
Mettre en œuvre les mesures nécessaires à la maîtrise de la concentration en légionelles (détartrage, purge, réglage de la température, travaux,...)

Renforcer la surveillance des paramètres physiques et microbiologiques

2) selon l'importance de la prolifération (10 000 UFC/l en *Legionella pneumophila*), les mesures sont renforcées :

En fonction de l'analyse bénéfice/risque faite au cas par cas, supprimer les usages à risque (bains bouillonnants, douches,...) et mettre en œuvre des moyens permettant de limiter l'exposition aux aérosols (lavage au gant, bain,...)

Mettre en œuvre les actions curatives nécessaires (nettoyage et désinfection, purge, montée en température de l'eau,...)

Assurer une information adaptée des malades accompagnée de conseils

Suivre l'efficacité des mesures mises en œuvre

Pour les autres établissements recevant du public, il pourra être procédé en fonction de la situation aux actions suivantes :

- interprétation contextuelle des résultats d'analyse : vérification de l'origine des écarts par rapport aux résultats d'analyses antérieures, recherche des causes de dysfonctionnement, confirmation du risque ;
- restriction des usages à risque (douches, bains à remous, ...) ;
- mesures correctives (entretien) au niveau des installations d'eau chaude sanitaire (production oulet réseaux) ;
- renforcement des contrôles et mise à jour de la stratégie d'échantillonnage ;
- intervention technique pour supprimer l'exposition : ces actions sont prises en application de l'article 4 de l'arrêté du 1^{er} février 2010 qui prévoit que, lorsque les seuils en légionelles ne sont pas respectés, "le responsable des installations prend sans délai les mesures correctives nécessaires au rétablissement de la qualité de l'eau et à la protection des usagers"
- désinfection curative par choc thermique ou chimique : elle ne doit intervenir que si elle est nécessaire, à l'issue de la mise en œuvre des autres actions, notamment lorsque les mesures correctives n'ont pas été suffisantes pour assurer le rétablissement de la qualité de l'eau.

5.2 Procédés et produits de traitement de l'eau

Afin de prévenir le développement des micro-organismes et de maintenir leur concentration dans l'eau à un niveau acceptable, des procédés et produits peuvent être mis en œuvre en traitement complémentaire de l'eau, continu ou discontinu, dans les réseaux d'eau chaude sanitaire en service.

Ces procédés et produits de traitement de l'eau doivent figurer dans les circulaires n°2000/166 du 28 mars 2000 et du 7 mai 1990 (annexes 2 et 3) relatives aux produits et procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine ou bénéficier d'une autorisation du ministre chargé de la santé, prise après avis de l'Anses (articles R.1321-48 et R.1321-55 du code de la santé publique).

Le tableau 5-5 présente la liste des procédés et produits de désinfection utilisables en traitement continu ou discontinu ainsi que les doses employées et les temps de contact.

TABLEAU 5-5 : produits et procédés de désinfection de l'eau utilisables en traitement continu ou discontinu

	Utilisation en traitement continu	Utilisation en traitement discontinu*
Produits		
Composés chlorés générant des hypochlorites (hypochlorite de sodium ou de calcium, chlore gazeux, hypochlorite de calcium)	≥ 0,3 mg/l et < 1 mg/l de chlore libre (selon le réseau, la qualité de l'eau et le pH)	10 mg/l de chlore libre pendant 8 heures (selon le réseau, la qualité de l'eau et le pH)
Dichloro-isocyanurates (de sodium ou de sodium hydratés)	non	10 mg/l en équivalent chlore libre pendant 8 heures
Dioxyde de chlore	≥ 0,3 mg/l et < 1 mg/l de chlore libre (selon le réseau, la qualité de l'eau et le pH)	non
Peroxyde d'hydrogène mélangé avec de l'argent*	non	100 à 1 000 mg/l de peroxyde d'hydrogène**
Soude	non	pH > 12 au moins 1 heure***
Procédés		
Traitement thermique	50° C dans le réseau et inférieur à 50° C dans les pièces de toilette	70° C pendant au moins 30 minutes
Filtration membranaire (seuil de coupure 0,2 µm) au point d'usage	oui	non
Traitement par rayonnement ultraviolet (250-260 nm)	oui	oui

* les modalités de désinfection préconisées pour les traitements discontinus n'ont été validées que pour de petits réseaux et les retours d'expérience ne permettent pas de les valider actuellement pour les réseaux de taille plus importante

** pour un temps de contact fonction de la concentration et pouvant aller jusqu'à 12 heures

*** cependant des précautions doivent être prises pour la tenue des matériaux. Cette solution doit être envisagée en dernier ressort et avec de grandes précautions eu égard au risque encouru par le personnel. Les produits doivent être neutralisés avant rejet dans les égouts.

- la désignation des produits chimiques dans les listes n'implique pas la garantie de résultat du procédé. Les résultats sur le maintien des micro-organismes, et en particulier des légionelles, à une concentration acceptable, sont notamment liés :
 - aux conditions d'emploi (dilution, composition de la préparation commerciale, mélanges de différents constituants de cette liste,...)
 - aux caractéristiques de l'eau.
- tout produit utilisé dans les réseaux d'eau destinée à la consommation humaine doit être autorisé par le ministère chargé de la santé. Si une société souhaite commercialiser un produit dont les composés ne sont pas indiqués dans les listes, une autorisation délivrée par le ministère de la santé est nécessaire.

Polyéthylène réticulé et dioxyde de chlore : un danger pour les réseaux d'eau des établissements de santé ? Chord F. et al., 2010

► Cette étude a consisté à réaliser un suivi prospectif de la contamination par *Legionella* spp. du réseau d'eau d'un bâtiment nouvellement construit (2002 - 2004) accueillant des immunodéprimés (cancérologie, oncopédiatrie et hématologie). Ce suivi analytique est corrélé aux actions correctives entreprises dont la mise en place d'un système de production de dioxyde de chlore. Une expertise technique du réseau d'eau et des analyses chimiques sont effectuées sur les tuyaux en polyéthylène réticulé et cuivre (installés uniquement sur la boucle oncopédiatrie et hématologie).

Dès l'ouverture du bâtiment en 2005, malgré une chloration choc, une contamination du réseau par *Legionella* spp. a été détectée. Après plusieurs actions correctives sans efficacité et devant l'impossibilité de réaliser des chocs thermiques, il est installé une pompe à dioxyde de chlore fin 2006 sur l'eau froide et chaude. Après plus de 6 mois, on observe l'efficacité du traitement d'eau avec négativation des prélèvements microbiologiques mais l'apparition de fuites d'eau sur les plûres du polyéthylène réticulé. La diminution des taux de dioxyde de chlore stabilisait pour un temps la situation au prix d'une remontée des taux de *Legionella* spp. Lors des mois suivants, des fuites de plus en plus nombreuses apparaissaient sur des parties de réseau normalement

sain. En 2008 et 2009, la situation s'aggrave avec de nombreuses fuites entraînant d'importantes dégradations des locaux.

Une recherche sur la nature de ces fuites a mis en évidence la dégradation du polyéthylène réticulé par le dioxyde de chlore. Mi-2009, on note l'apparition de fuites sur la boucle en cuivre, ce dernier étant attaqué par les produits de dégradation du polyéthylène réticulé sous l'action du dioxyde de chlore.

L'expertise technique a conclu, en 2009, en la nécessité de changer l'ensemble du réseau d'eau de l'établissement de santé.

Le traitement en continu du réseau d'eau pour lutter contre le risque "légionelle" n'est pas recommandé mais est parfois nécessaire dans le cas de patients très immunodéprimés. Dans le cas relaté, le polyéthylène réticulé a été très rapidement dégradé par le dioxyde de chlore entraînant de plus l'endommagement d'une boucle en cuivre. De plus en plus d'établissements en construction utilisent le polyéthylène réticulé pour leur réseau d'eau. Au vu de l'expérience décrite, les auteurs attirent l'attention sur l'absence de recul sur sa longévité et sa compatibilité avec les traitements utilisés pour lutter contre les légionelles.

Les traitements chimiques

Ils consistent à mettre en œuvre de manière permanente un procédé ou une injection de produit à faible dose (*désinfection continue ou discontinue*) afin d'obtenir la maîtrise de la prolifération des micro-organismes en suspension dans l'eau.

Ils doivent être réservés à des situations exceptionnelles lorsque les autres mesures préventives (relatives à la conception, la maintenance, la température,...) ne peuvent être mises en œuvre de manière satisfaisante. En effet, il ne faut pas négliger les inconvénients possibles de tels traitements : risques liés aux sous-produits éventuels, effets corrosifs sur les réseaux et modifications de l'écosystème microbien avec apparition de micro-organismes particuliers.

Le traitement thermique

Pour les installations de distribution d'eau chaude sanitaire, le respect de températures suffisamment élevées, selon l'arrêté interministériel du 30 novembre 2005, permet de limiter le développement des légionelles. Les modalités d'application de cet arrêté sont explicitées dans la circulaire DGS/DSC/DGUHC/DGE/DPPR n°126 du 3 avril 2007.

Le tableau 5-6 précise la compatibilité apparente des produits et procédés de désinfection de l'eau avec les matériaux constitutifs des installations, dans la limite de concentrations et de temps de contact définis par l'agrément ou à défaut validés par les fournisseurs.

TABLEAU 5-6 : Compatibilité entre les produits et procédés de désinfection de l'eau, utilisés dans les réseaux en service, et les matériaux des installations d'eau (selon le Guide technique de l'eau dans les établissements de santé – 2005)

Matériaux constitutifs des installations d'eau	Produits de désinfection utilisables en traitement continu		Procédé de désinfection utilisable en traitement continu
	Composés chlorés générant des hypochlorites	Dioxyde de chlore	Température
Ballons			
Résine organique	0	0	0
Mortier ciment adjuvanté	0	0	0
Email	0	0	0
Acier galvanisé	0	0	< 60° C
Conduites			
Acier galvanisé	0	0	< 60° C
Cuivre	0	0	0
Inox	0	0	0
Polyéthylène réticulé	0	0	< 70° C
CPVC	0	0	< 70° C
Echangeur			
Étain	0	0	0
Nickel	0	0	0
Cuivre	0	0	0
Inox	0	0	0
Raccord, robinetterie			
Bronze	0	0	0
Laiton	0	0	0
Nickel-Chrome	0	0	0
Elastomère (joints)	M	M	?

0 = compatible M = mauvais comportement aux chocs répétés N = incompatibilité ? = la compatibilité est fonction du produit et doit être fournie par le fabricant

Les traitements physiques

La filtration terminale (microfiltration sur membrane à 0,22 micron) a pour objectif d'éliminer la contamination bactérienne aux points d'usage à risques. Il existe deux types de filtres :

- des filtres réutilisables un certain nombre de fois (après stérilisation) Il faudra s'assurer du maintien de la qualité des filtres dans le temps, en tenant compte des indications du fabricant.
- des filtres dits à usage unique ou non réutilisables, qui doivent être renouvelés au bout de quelques jours ou semaines, selon les données du fabricant.

Le filtre peut devenir un véritable nid microbien et relarguer accidentellement des micro-organismes, notamment en fonction des aléas de variation de pression. Il doit être mis en place, changé et entretenu selon les procédures définies par le fabricant.

Le traitement par rayonnement ultra-violet (longueur d'onde comprise entre 250 et 260 nm) est souvent utilisé au point d'usage, en raison de son absence de rémanence (Squinazi et Pellet, 2009 ; Squinazi et al., 2011). Toute garantie de désinfection par les UV impose une dose d'irradiation suffisante pour inactiver les micro-organismes. Les molécules organiques ou minérales, les matières en suspension ou les colloïdes, qui absorbent les rayonnements, constituent une interférence à leur efficacité.

L'installation doit être dimensionnée en fonction des débits à traiter. Son fonctionnement doit pouvoir être contrôlé à tout moment. Les lampes ou générateurs d'ultraviolets doivent être remplacés suivant les indications du constructeur. Un nettoyage régulier de l'installation doit être assuré.

La désinfection par les rayons ultraviolets est soumise aux circulaires DGS/PGE/1D n°52 du 19 janvier 1987 et du 28 mars 2000.

Cas pratiques

A l'aide des cas pratiques suivants (encadrés), on va pouvoir constater qu'il existe des causes diverses à la contamination des réseaux intérieurs de distribution d'eau. Il n'y a pas de recette standard pour rendre une installation irréprochablement hygiénique. Détecter les foyers de contamination dans des installations complexes est un véritable travail de détective. Par la suite, des contrôles à long terme sont nécessaires pour s'assurer que la contamination a définitivement disparu.

Cela vaut tant pour les nouvelles installations que pour celles qui sont en service depuis des années. Tout doit être suivi dès la phase de planification. Durant l'exécution, tous les éléments doivent en outre être manipulés et installés correctement, afin de ne pas encrasser l'installation avant sa mise en service.

Pseudomonas dans une installation d'eau potable

(d'après Hygiène de l'eau dans les installations résidentielles - Constatations des experts allemands - L'entreprise, novembre 2010)

► Une installation d'eau potable est transformée après une contamination à *Legionella* (concentrations jusqu'à 140 000 UFC/L). Après l'intervention, la concentration chute drastiquement, d'abord jusqu'à 1 000 UFC/L, puis jusqu'à la limite de détection.

Dans le cadre d'un contrôle de routine, une contamination à *Pseudomonas* est détectée dans un échantillon d'eau froide. Une enquête est réalisée ; elle permet de constater une contamination systématique (même une croissance bactérienne proliférante) dans une colonne. Il n'est pas constaté de *Pseudomonas* dans le raccordement d'eau froide de l'habitation.

Les premières mesures d'assainissement (rinçage) n'ont pas d'effet, si bien qu'il est décidé de placer après le compteur d'eau une pompe de dosage avec du dioxyde de chlore stabilisé pour un traitement en continu. Par ailleurs, les douches sont condamnées jusqu'à ce qu'on soit certain de l'efficacité des mesures prises.

Les contrôles laissent penser que le dosage du dioxyde de chlore n'a aucun effet. C'est pourquoi la colonne est nettoyée à l'eau chaude (80° C pendant plusieurs heures). Toutefois, la contamination à *Pseudomonas* persiste.

Les douches sont équipées de filtres au niveau de la colonne, de manière à pouvoir les remettre en service.

Pour savoir si la contamination se situe dans la robinetterie de douche ou dans les conduites, les deux sont analysées séparément. Lors de l'analyse de la robinetterie de douche, on trouve des *Pseudomonas* sur toutes les pièces (filtres, conduites internes, membranes des éléments thermostatiques, etc.). Ce qui tendrait à prouver que la contamination provient de la conduite d'alimentation.

La conduite d'alimentation est encore une fois rincée à l'eau chaude. Une installation de désinfection est montée pour briser le biofilm et les douches restent équipées de filtres.

Des mesures effectuées lors du rinçage, il ressort

clairement que la contamination se trouve en amont de la robinetterie (chute partielle de la concentration bactérienne après rinçage).

L'analyse systématique de la colonne démontre une contamination du filtre à particules après l'installation de désinfection. Une fois le filtre enlevé, on n'a alors plus constaté que quelques contaminations dans certaines douches, la plupart avec des quantités beaucoup plus petites en bactéries.

Une nouvelle analyse des robinets de douche démontre que les membranes des vannes à aimant et des chambres de mélange, derrière les membranes, sont tout aussi contaminées par *Pseudomonas*.

Il apparaît par ailleurs que la pompe doseuse de l'installation de désinfection est contaminée. On enlève cette installation.

D'autres parties contaminées de canalisations sont encore découvertes, parfois même de quelques mètres de long : alimentation en eau chaude de la chaudière, une partie au diamètre variable. Une fois ces parties remplacées, les traces de *Pseudomonas* deviennent rares et en petites concentrations.

Entre-temps, la désinfection au dioxyde de chlore dans la conduite principale de l'eau froide démarre de nouveau. Elle avait été interrompue lors de la désinfection locale dans la colonne.

Après quelques semaines, toute trace de *Pseudomonas* a disparu, et la situation est ensuite restée stable.

Bien qu'il s'agisse d'un système de conduite clairement court, la contamination à *Pseudomonas* est apparue très persistante. Il a fallu beaucoup d'efforts pour détecter la cause. Il s'est en outre passé deux ans environ entre le moment où on a constaté pour la première fois la contamination et celui où on a trouvé la cause.

Même de petits segments de conduite ou d'appareils contaminés (ici des pompes doseuses et des filtres à particules) peuvent être une source de contamination de longue durée.

Contamination à la légionelle dans une installation d'eau chaude sanitaire

(d'après Hygiène de l'eau dans les installations résidentielles - Constatations des experts allemands - L'entreprise, novembre 2010)

► Un hôpital accueille durant deux mois huit patients atteints de légionellose. Tous les patients ont déjà été hospitalisés 5 à 10 jours auparavant dans ce même établissement pour d'autres raisons. Il s'agit d'un groupe hétérogène en termes de sexe, d'âge, d'état de santé général et de lieu d'habitation. Deux cas ont dû être admis aux soins intensifs ; un des deux décède après deux jours.

Un enquête sur le réseau de canalisations d'eau de l'hôpital démontre la présence de concentrations élevées de Legionella dans les barres de douches (plus de 10 000 UFC/L) et de concentrations plus faibles en divers endroits dans les conduites d'eau froide (moins de 1 000 UFC/L). L'eau chaude sanitaire des conduites centrales (préparation et conduites de circulation) est totalement exempte de Legionella. Dans certains points de puisage périphériques, de minimes concentrations sont décelées (moins de 100 UFC/L).

Une analyse moléculaire de la souche de Legionella démontre que le type de bactérie en question est particulièrement virulente. Les patients au système immunitaire déficient courent donc un risque, même en cas de -relativement- faibles concentrations en germes pathogènes dans l'eau froide.

Une première mesure est le remplacement des barres et des têtes de douche dans les chambres des patients. Les points de puisage sont équipés de filtres stériles, tout comme dans la section "soins intensifs". Suite à cela, plus aucune contamination n'est décelée.

Dans une deuxième phase, on renouvelle le système d'eau chaude, dont le volume passe de 5 000 à 1 000 litres. La nouvelle installation est en mesure de garantir la température demandée de 60° C jusque dans les zones les plus éloignées du système. La température peut même être portée à 80° C dans l'optique d'une désinfection thermique. Dans le cadre de la révision des canalisations d'eau, plus de 190 zones mortes (zones de stagnation) sont éliminées, pour une longueur de conduite allant

jusqu'à 30 m pour éviter la stagnation dans les canalisations d'eau froide. Tous les points de puisage sont rincés 5 minutes par jour. Les points de puisage des chambres inoccupées sont ensuite rincés à nouveau pendant 10 minutes, avant l'arrivée de nouveaux patients.

Après ces opérations, la quasi-totalité des échantillons d'eau recueillis sont exempts de Legionella. On relève seulement de minimes concentrations de 50 UFC/L dans quelques échantillons d'eau froide.

En conséquence, les filtres sur les points de puisage sont ôtés (sauf aux soins intensifs) et un protocole de rinçage est instauré. Chaque point de puisage doit désormais être rincé au moins deux fois 10 minutes par semaine.

Plus aucune trace de Legionella n'est détectée à la suite de ces mesures.

Au début de l'année, un cas suspect de légionellose est découvert.

Etant donné que tous les échantillons d'eau chaude et d'eau froide sont exempts de Legionella, les douches sont analysées de manière plus approfondie. On y découvre alors de fortes concentrations en Legionella, surtout dans le cas de douches qui ne sont pas utilisées depuis plus d'un jour. Un régime spécial de rinçage est alors instauré pour ces douches : le personnel de nettoyage devra chaque jour rincer les douches à l'eau chaude durant au moins 10 minutes. Tous les échantillons recueillis sont ensuite exempts de Legionella.

La contamination via, par exemple, des barres de douche, peut localement conduire à des concentrations très élevées en Legionella. Avec ces bactéries dangereuses pour la santé, cela peut conduire à des décès.

Toute stagnation doit alors être évitée à l'aide d'un régime de rinçage adapté. Dans le cas présent, un régime spécial fut nécessaire pour maintenir la croissance de la bactérie sous contrôle.

La qualité de l'eau dépend de la qualité des réseaux

► *L'eau, élément essentiel à la vie, est un enjeu capital de santé publique et la préservation de la qualité de l'eau dans les réseaux intérieurs de distribution des bâtiments devient une priorité absolue.*

La prolifération des bactéries, et notamment des légionelles, dans les réseaux intérieurs de distribution d'eau des établissements recevant du public - hôtels et surtout établissements de santé - et des immeubles d'habitation, peut devenir un risque sanitaire, en particulier chez les personnes les plus fragiles.

La méconnaissance des paramètres de dégradation de la qualité de l'eau, et parfois même la totale ignorance des causes et des moyens de prévention ainsi que la propagation répétée de contre vérités évidentes ou de solutions miracles, peuvent conduire à de nombreuses erreurs aux conséquences fâcheuses pour des établissements abritant notamment des personnes fragilisées (personnes âgées, malades,...).

Plusieurs facteurs participent à la dégradation de la qualité de l'eau dans les réseaux intérieurs de distribution : eaux stagnantes ou vitesses de circulation insuffisantes, bras morts ou boucles, températures entre 25 et 50° C, dépôts et concentrations de tartre, boues et sédiments dus à la corrosion, concentrations, même faibles, de certains métaux tels que le fer, zinc et de substances chimiques comme le potassium, vieillissement des installations, entretien insuffisant, nature des matériaux,...

Des recommandations ont été publiées ces dernières années^{1,2,3,4}, elles visent à réduire, voire supprimer les risques de contamination dans les réseaux intérieurs de distribution.

La sécurité des réseaux passe par une bonne conception et une maintenance rigoureuse des installations afin de répondre parfaitement aux nouveaux impératifs sanitaires.

1 Gestion du risque lié aux légionelles - Conseil supérieur d'hygiène publique de France - Editions Tec et Doc, Lavoisier 2002

2 Réseaux d'eau destinée à la consommation humaine à l'intérieur des bâtiments - Partie 1 : Guide technique de conception et de mise en œuvre. CSTB 2003

3 L'eau dans les établissements de santé - Guide technique. Ministère de la santé, de la famille et des personnes handicapées (à paraître)

4 Groupe Eau - Santé : Eaux des établissements de santé - Laboratoire Viatrix

Mieux vaut prévenir que guérir

► La bonne conception du réseau et le choix de matériaux limitant la corrosion et le tartre, permettent de réduire dès le départ les risques de prolifération des bactéries dans les circuits.

Les réseaux d'eau chaude sanitaire

La circulaire DGS/DHOS n°2002-243 du 22 avril 2002, relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé, a fixé trois priorités :

- éviter la stagnation et assurer une bonne circulation de l'eau ;
- lutter contre l'entartrage et la corrosion, par une conception et un entretien adapté à la qualité de l'eau et aux caractéristiques de l'installation ;
- maintenir l'eau à une température élevée dans les installations, depuis la production et tout au long des circuits de distribution, et mitiger l'eau au plus près possible des points d'usage.

La mise en œuvre de ces actions préventives limite, voire supprime la nécessité de réaliser des interventions curatives ponctuelles sur le réseau, tels que des traitements chocs par des désinfectants chimiques (chlore,...) ou des chocs thermiques, qui ne garantissent pas une réduction pérenne de la contamination.

En outre, ces traitements chocs à répétition peuvent avoir pour conséquence de modifier l'équilibre microbien et de dégrader les installations, conduisant ainsi à la création de nouveaux gîtes favorables à la colonisation des bactéries.

Ces actions curatives peuvent toutefois être nécessaires à la suite de la mise en évidence dans l'eau de concentrations excessives en micro-organismes (p.ex. légionelles) ou bien lors de l'apparition de cas de maladie(s) infectieuse(s) (p.ex. légionellose) dont l'origine peut être associée à la qualité de l'eau distribuée.

L'utilisation des désinfectants en continu, à faible dose, dans de l'eau chaude sanitaire est à éviter autant que possible (risques liés aux sous-produits toxiques éventuels, effets corrosifs sur les réseaux, apparition d'espèces résistantes). Cependant cette éventualité ne peut être écartée et doit être réservée à des situations exceptionnelles lorsque les mesures préventives ne peuvent être mises en œuvre de manière satisfaisante. Les produits et procédés de traitement disposent d'une autorisation du ministère chargé de la santé.

L'utilisation discontinuée de désinfectants (p.ex. tous les mois) en traitement choc, précédé, à un rythme semestriel ou annuel, d'un nettoyage, n'a été validée que pour des petits réseaux.

Les réseaux intérieurs d'eau froide

Ils peuvent aussi être colonisés si les canalisations sont anormalement réchauffées, soit par contact avec le réseau d'eau chaude, soit en raison d'une température élevée des locaux, soit par arrivée d'eau chaude dans l'eau froide au niveau des mitigeurs d'eau.

Il convient donc de veiller à ce que la température de l'eau froide ne dépasse pas 20° C, et à ce que les canalisations d'eau froide et d'eau chaude soient calorifugées séparément.

Nettoyage et désinfection : des précautions indispensables

► Les réseaux de distribution doivent être conçus de manière à limiter l'installation de biofilms et/ou de dépôts de produits de corrosion, qui, du fait de leur constitution, nuisent d'une part à l'action des désinfectants, et d'autre part, conduisent à limiter l'efficacité de certains traitements curatifs. En outre, les traitements mis en œuvre sont d'autant plus faciles à réaliser que le réseau a été

bien conçu à l'origine et que les matériaux ont été choisis de manière raisonnée.

L'effet des produits de désinfection sur les matériaux doit faire l'objet d'une attention particulière. Par exemple, de nombreux matériaux synthétiques (comme les polyoléfines) et métalliques (y compris l'inox) ne résistent pas aux traitements avec des

produits acides et, le cas échéant, un traitement de protection doit être envisagé après emploi.

Toutes les opérations de réparation via l'installation de nouvelles conduites doivent être effectuées de telle sorte qu'elles n'induisent pas une contamination du réseau. A l'achèvement des travaux, des purges permettent d'éliminer les particules et les souillures induites et une désinfection finale permet de garantir la qualité de l'eau séjournant dans le réseau.

Un avis du Conseil supérieur d'hygiène publique de France, en date du 8 juillet 2003, préconise pour les réparations sur des conduites en PVC ou C-PVC un séchage au minimum d'une heure suivi de 10 rinçages d'un volume équivalent à celui compris entre la réparation et le point de puisage.

Les réseaux d'eau, en particulier d'eau chaude sanitaire, nécessitent un entretien rigoureux et régulier. Les opérations d'entretien se font sur des réseaux hors service et comprennent le nettoyage des installations (lutte contre le tartre et la corrosion), et, souvent la désinfection des installations. Ces opérations peuvent être suivies d'un traitement de protection si l'état du réseau le nécessite.

Traitements de nettoyage

Ils sont utilisés soit pour dissoudre les dépôts et incrustations (constitués de carbonates de calcium et/ou d'hydroxydes de fer), soit pour retirer tout ou partie du biofilm. Le réseau doit être impérativement détartré et nettoyé pour que la désinfection soit efficace.

Différentes techniques peuvent être utilisées : essentiellement par méthode chimique, plus rarement à l'air et à l'eau ou à l'eau seule.

Dans certains cas (réseau atteint par la corrosion), la meilleure solution peut être de procéder à la rénovation du réseau avec des matériaux présentant des risques d'entartrage moindres et insensibles à la corrosion.

Traitements de désinfection

Ils ne sont applicables qu'à la condition que le réseau traité soit en bon état (absence de tartre, de produits de corrosion, de bras morts). Deux méthodes sont proposées :

Le traitement thermique

Il consiste à faire circuler de l'eau à une température à 70° C environ pendant 30 minutes dans l'ensemble des réseaux de distribution, de la production jusqu'au point de puisage. Cette opération doit être suivie d'un rinçage soigneux des installations.

Ce traitement nécessite :

- la présence de matériaux supportant le traitement thermique,
- une capacité thermique des installations pour atteindre 70° C aux points les plus éloignés,
- des mesures importantes de protection pour éviter les brûlures pendant son utilisation (affichage, personnel présent au point de puisage,...)

Le traitement chimique

Les produits de traitement des installations de distribution utilisables sont :

- les composés chlorés générant des hypochlorites et les dichloroisocyanurates : 100 mg/l de chlore libre pendant 1 heure ou 50 mg/l de chlore libre pendant 12 heures ou 15 mg/l de chlore libre pendant 24 heures,
- le peroxyde d'hydrogène mélangé à l'argent 100 à 1 000 mg/l jusqu'à 12 heures,
- l'acide peracétique en mélange avec H₂O₂ : 1 000 ppm en équivalent H₂O₂ pendant 2 heures,
- la soude : pH >12 au moins une heure.

Les résultats sont liés, d'une part aux conditions d'emploi, d'autre part aux caractéristiques de l'eau. Il convient de vérifier la parfaite compatibilité à certains produits chlorés du commerce pouvant contenir des additifs dont on devra s'assurer de leur neutralité vis-à-vis de certains matériaux.

Ce type de traitement peut ne pas présenter une efficacité satisfaisante vis-à-vis des bactéries situées dans le biofilm ou dans les dépôts de produits de corrosion. Afin d'obtenir un bon résultat, il peut être nécessaire de répéter ce traitement plusieurs fois.

Dans tous les cas, un rinçage suffisant doit être réalisé in fine jusqu'à disparition de toute trace de la solution désinfectante afin que le réseau remis en service délivre une eau conforme aux critères de potabilité en vigueur.

LE BIOFILM

- Allesen-Holm M., Barken K.B., Yang L., Klausen M., Webb J.S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilm. *Mol Microbiol* (2006) 59 (4): 1114-28
- Atkinson S., Williams P. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface* (2009) 6 (40) : 959-78
- Austin J.W., Sanders G., Kay W.W., Collinson S.K. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* (1998) 15, 162 (2): 295-301
- Barraud N., Hasset D.J., Hwang S.H., Rice S.A., Kjelleberg S., Webb J.S. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* *J Bacteriol* (2006) 188 (21): 7344-53
- Boles B.R., Thoendel M., Singh P.K. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms *Mol Microbiol* (2005) 57 (5): 1210-23
- Boles B.R., Horswill A.R. Age-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms *PLoS Pathog* (2008) 4 (4):
- Bos R., Busscher H., Geertsema-Doornbush G.I., Van der Mei H.C. Adhesion competition between *Streptococcus thermophilus* and *Candida* species. In *Biofilms, community interactions and control*. Ed. Wimpenny J., Handley P., Gilbert P., Lappin-Scott H. and Jones M., *Bioline* (1997) U.K: 113-118
- Bos R., Van der Mei H.C., Busscher H. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study *Fems Microbiology Reviews* (1999) 23 (2): 179-230
- Byrd M.S., Sadovskaya I., Vinogradov E., Lu H., Sprinkle A.B., Richardson S.H., Ma L., Ralston B., Parsek M.R., Anderson E.M., Lam J.S., Wozniak D.J. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production *Mol Microbiol* (2009) 73 (4): 622-38
- Caiazza N.C., Merritt J.H., Brothers K.M., O'Toole G.A. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 *J Bacteriol* (2007) 189 (9): 3603-12
- Cammarota M.C., Sant'Anna Jr G.L. Metabolic blocking of exopolysaccharides synthesis : effects on microbial adhesion and biofilm accumulation *Biotechnology letters* (1998) 20 : 1-4
- Characklis W.G. *Biofilms : a basis for an interdisciplinary approach*. In *Biofilms*. Characklis W.G, Marshall K.C. Ed. John Wiley and Sons New York (1989): 3-15
- Costerton J.W. *Sci Amer* (1978) 238: 86
- Costerton J.W., Lambe D.W., Mayberry-Carson K.J., Tober-Meyer B. Cell wall alterations in *Staphylococci* growing in situ in experimental osteomyelitis *Canadian Journal of Microbiology* (1987) 33: 142-150
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. *Microbial biofilms Annu Rev Microbiol* (1995) 49: 711-45
- Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm *Science* (1998) 280 (5361): 295-8
- Declerck P. *Biofilms : the environmental playground of Legionella pneumophila. Enviro Microbiol* (2010)
- Deretic V., Schurr M.J., Boucher J.C., Martin D.W. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis : environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factor *J Bacteriol* (1994) 176: 2773-2780
- Donlan R.M. *Biofilms microbial life on surfaces Emerg Infect Dis* (2002) 8 (9): 881-90
- Fletcher M. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium substratum separation distance *J Bacteriol* (1988) 170: 2027-2030
- Essomba C. Mécanismes de résistance aux désinfectants de *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* obtenus en biofilms. Thèse de Doctorat (1996), Université de Paris Sud.
- Ganeshnarayan K., Shah S.M., Libera M.R., Santostefano A., Kaplan J.B. Poly-N-acetylglucosamine matrix polysaccharide impedes fluid convection and transport of the cationic surfactant cetylpyridinium chloride through bacterial biofilms *Appl Environ Microbiol* (2009) 75 (5): 1308-14
- Garry P. Propriétés physico-chimiques de surfaces en polyuréthane et conséquences sur l'encrassement et l'adhésion de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* Thèse de Doctorat (1997) Université Claude Bernard, Lyon
- Groupe Eau-Santé Eaux des établissements de santé : *Lexique pratique* (2006)
- Hancock I.C. *Microbial cell surface architecture. In Microbial cell surface analyses* Mozes N., Handley P.S., Busscher H.J. and Rouxhet P.G. VHC Publishers, New York (1991)
- Hengge-Aronis R. The general stress response in *Escherichia coli*. In Storz G., Hengge-Aronis R. Eds *Bacterial stress responses*, ASM, Washington DC (2000): 161-179
- Hermansson M. The DLVO theory in microbial adhesion *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* (1999) 14 (1-4): 105-119
- Holah J.T., Thorpe R.H. Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. *J Appl Bacteriol* (1990) 69 (4): 599-608
- Izano E.A., Amarante M.A., Kher W.B., Kaplan J.B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Saphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* (2008) 74 (2): 470-6
- Kjelleberg S. *Starvation in bacteria Plenum Press, New York and London* (1993)
- Latasa C., Solano C., Penades J.R., Lasa I. Biofilm-associated proteins *C R Biol* (2006) 329 (11) : 849-57
- Liles M.R., Viswanathan V.K., Cianciotto N.P. Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infect Immun* (1998) 66 (4): 1776-82
- Mack D., Haeder M., Siemssen N. Association of Biofilm production of coagulase-negative *Staphylococci* with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesion *The Journal of Infectious Diseases* (1996) 174 : 881-884
- Mann E.E., Rice K.C., Boles B.R., Endres J.L., Ranjit D., Chandramohan L., Tsang L.H., Smeltzer M.S., Horswill A.R., Bayles K.W. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation *PLoS One* (2009) 4 (6): e5822
- Massol-Deya A.A., Whallon J., Hickey R.F., Tiedje J.M. Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater *Appl Environ Microbiol* (1995) 61 (2): 769-77
- Matin A., Harakeh S. Effect of starvation on bacterial resistance to disinfectants In Mc Fetters G.A. (eds) *Drinking water microbiology : progress and recent developments*. Brock/Springer series in Contemporary science, Springer Verlag, New York (1990) 88-104

- Martin A. Physiology, molecular biology and applications of the bacterial starvation response *J Appl Bacteriol Symp. Suppl.* (1992) 73: 49S-57S
McEldowney S., Fletcher M. Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces *Arch Microbiol* (1987) 148 : 57-62
- Meir E., Yagil E. Regulation of *Escherichia coli* catalase by anaerobiosis and catabolic repression *Current Microbiology* (1990) 20, 139-143
- Merino S., Shaw J.G., Tomas J.M. Bacterial lateral flagella : an inducible flagella system *FEMS Microbiol Lett* (2006) 263 (2): 127-35
- Morita R.Y. Bacteria in oligotrophic environments. Starvation-survival lifestyle. Chapman and Hall, New-York, (1997)
- O'Toole G.A., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* (1998) 30 (2): 295-304
- Palmer J., Flint S., Brooks J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* (2007) 34 (9): 577-88
- Parsek M.R., Tolker-Nielsen T. Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Opin Microbiol* (2008) 11 (6): 560-6
- Percival S.L., Knapp J.S., Edyvean R.G.J., Wales D.S. Biofilms, mains water and stainless steel *Wat Res* (1998) 24: 239-243
- Pratt L.A., Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation : roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili *Mol Microbiol* (1998) 30 (2): 285-93
- Prigent-Combaret C., Vidal O., Dorel C., Lejeune P. Abiotic surface sensing and biofilm-dependant regulation of gene expression in *Escherichia coli* *J Bacteriol* (1999) 181: 5993-6002
- Pulcini E. Variations in protein expression during initial adhesion : a proteomics approach *Biofilms* (2000) July 16-24, Big Sky, Montana, USA
- Ryder C., Byrd M., Wozniak D.J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development *Curr Opin Microbiol* (2007) 10 (6): 664-8
- Saldana Z., Xicohtencatl-Cortes J., Avelino F., Phillips A.D., Kaper J.B., Puente J.L., Giron J.A. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environ Microbiol* (2009) 11 (4): 992-1006
- Sauer K., Camper A.K. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth *J Bacteriol* (2001) 183 (22): 6579-89
- Skillman L.C., Sutherland I.W., Jones M.V. Co-operative biofilm formation between two species of Enterobacteriaceae. In Winpenny J., Handley P., Gilbert P., Lappin-Scott H. and Jones M. (eds) *Biofilms community interaction and control*. Bionline publications, U.K., (1997): 119-127
- Stone B.J., Abu Kwaiq Y. Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila* : identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* (1998) 66 (4): 1768-75
- Stoodley P., Debeer D., Lewandowski Z. Liquid Flow in Biofilms Systems. *Appl Environ Microbiol* (1994) 60 (8): 2711-2716
- Stoodley P., Boyle J.D., Dodds I., Lappin-Scott H.M. Consensus model of biofilm structure. In *Biofilms, community and control*, Ed. Winpenny J., Handley P., Gilbert P., Lappin-Scott H. and Jones M., Bionline, U.K. (1997)
- Sule P., Wadhawan T., Carr N.J., Horne S.M., Wolfe A.J., Pruss B.M. A combination of assay reveals biomass differences in biofilms formed by *Escherichia coli* mutants. *Lett Appl Microbiol* (2009) 49 (3): 299-304
- Van Dellen K.L., Houot L., Watnick P.I. Genetic analysis of *Vibrio cholerae* monolayer formation reveals a key role for DeltaPsi in the transition to permanent attachment *J Bacteriol* (2008) 190 (24): 8185-96
- Vanhaecke E., Remon J.P., Moors M., Raes F., De Rudder D., Van Peteghem A. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel : role of cell surface hydrophobicity *Appl Environ Microbiol* (1990) 56 (3): 788-95
- Van Oss C.J., Good R.J., Chaudhury M.K. The role of the van der Waals Forces and Hydrogen Bonds in "Hydrophobic Interactions" between Biopolymers and Low Energy Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* (1986) 111 (2): 378-390
- Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecule* (2009) 14 (7): 2535-54
- Witchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* (2002) 295 (5559): 1487
- Zacheus O.M., Ilvanainen E.I., Nissinen T.K. et al. Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water *Wat Res* (2000) 34: 63-70
- Zhang L.H., Dong Y.H. Quorum sensing and signal interference : diverse implications. *Mol Microbiol* (2004) 53 (6): 1563-71

L'ÉVALUATION DU BIOFILM AU CONTACT DES MATÉRIAUX

British Standard 6920-2.4: 2000. Suitability of non-metallic products for use in contact with water intended for human consumption with regard to their effect on the quality of the water. Part 2 : methods of test – section 2.4 : Growth of aquatic microorganisms test

Colbourne J.S., Brown D.A. Dissolved oxygen utilization as an indicator of total microbial activity on non-metallic materials in contact with potable water. *J. Appl. Bacteriol.* (1979) 47: 223 - 231

CPDW project. Assessment of the microbial growth support potential of products in contact with drinking water. Interlaboratory testing for Enhancement of Microbial Growth (2005 – 2006).

Directive n°98/83/CE du 03/11/1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

Enkiri F., Legrand J.-Y., Squinazi F., Ponelle J.-C., Leroy P. Assessment of microbial potential of six materials used in drinking water distribution systems. *Eur. J. Water Qual.* (2006) 37: 175-188

Enkiri F., Mouton J., Bernhard O., Crespin M., Challemel O., De Baynast H., Squinazi F. Installations intérieures de distribution d'eau : influence des « traitements répétés » de trois matériaux sur l'aptitude à promouvoir la croissance microbienne. In « Journées Information Eaux », Tome 1, 28 - 30 septembre 2010

Joint Research Project (1994) CPDW. Development of harmonised tests to be used in the European Approval Scheme concerning Construction Products in contact with Drinking Water (2000 – 2003)

Norme CEN/TC 164/WG3/AHG3/N 1019 : août 2009. Influence of materials on water intended for human consumption. Promotion of Microbiological Growth. Önorm B 5018 : 2002. Prüfung der Verkeimungsneigung von Trinkwasserrohren. Teil : Prüfverfahren; Teil 2 : Bewertung. Österreichisches Normungsinstitut, 1020 Wien

PrEN /TC 164/WG3 : septembre 2010. Influence of materials on water intended for human consumption – Enhancement of microbial growth (EMG): Method 1: measured by ATP. Method 2: measured by biomass volume. Method 3: measured by mean dissolved oxygen depletion

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

Rogers J., Dowsett A.B., Dennis P.J., Lee V., Keevil C.W. Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* (1994) 60 (6): 1842-1851

Schoenen D., Schöler H.F. *Trinkwasser und Werkstoffe: Praxisbeobachtungen und Untersuchungsverfahren.* Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1983

Technische Regel Standard (Code of Practice) W 270: november 2007. Microbial Enhancement on Materials to Come into Contact with Drinking Water – Testing and Assessment. DVGW Deutsche Vereinigung des Gas- und Wasserfaches, Bonn.

Van Der Kooij D., Veenendaal H.R. Assessment of the biofilm formation of synthetic materials in contact with drinking water during distribution. In "Proceedings of AWWA Water Quality Technology Conference" Miami, Florida, Nov. 1993: 1395-1407

Van der Kooij D. Biomass Production Potential (BPP) of materials in contact with treated water: method and significance. Kiwa, October 2001

Van der Kooij D., Veenendaal H.R. Biomass Production Potential of materials in contact with drinking water: method and practical importance. *Water Sci. Technol. Water Supply* (2001) 1 (3): 39-45

Van der Kooij D., Albrechtsen H.J., Corfitzen C.B. et al. Assessment of the microbial growth support potential of products in contact with drinking water - Development of the harmonised tests to be used in the European Approval Scheme concerning Construction Products in contact with Drinking Water. European Commission. CPDW project: EUR 20832 EN. July 2003

Van der Kooij D., Veenendaal H.R., Scheffer W.J.H. Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Res.* (2005) 39: 2789-2798

Veenendaal H.R., Van der Kooij D. Biofilm Formation Potential of Materials used in household plumbing systems. Kiwa, June 1999

Yu J., Kim D. and Lee T. Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials. *Water Sci. Technol.* (2010) 61-1: 163-171

LES MICRO-ORGANISMES HYDRIQUES D'INTÉRÊT SANITAIRE

Legionella pneumophila

Ader F., Le B.R., Fackeur R., Raze D., Menozzi F.D., Viget N., Faure K., Kipnis E., Guery B., Jarraud S., Etienne J., Chidiac C. In vivo effect of adhesion inhibitor heparin on *Legionella pneumophila* pathogenesis in a murine pneumonia model. *Intensive Care Med.* (2008) 34: 1511-1519
Baron P.A., Willeke K. Respirable droplets from whirlpools : measurements of size distribution and estimation of disease potential. *Environ. Res.* (1986) 39: 8-18
Baroin-Tourancheau A., Delgado P., Perasso R., Adoutte A. A broad molecular phylogeny of ciliates : identification of major evolutionary trends and radiations within the phylum. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* (1992) 89: 9764-9768

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

Berk S.G., Ting R.S., Turner G.W., Ashburn R.J. Production of Respirable Vesicles Containing Live *Legionella pneumophila* Cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* (1998) 64: 279-286

Bollin G.E., Plouffe J.F., Para M.F., Hackman B. Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Appl. Environ. Microbiol.* (1985) 50: 1128-1131

Bouyer S., Imbert C., Rodier M.H., Héchard Y. Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles *Environ Microbiol.* (2007) 9: 1341-1344

Breiman R.F., Field B.S., Sanden G.N., Volmer L., Meier A., Spika J.S. Association of shower use with Legionnaires' disease. Possible role of amoebae. *JAMA* (1990) 263: 2924-2926
Brieland J., McClain M., Le Gendre M., Engleberg C. Intrapulmonary *Hartmanella vermiformis* : a potential niche for *Legionella pneumophila* replication in a murine model of legionellosis. *Infect. Immun.* (1997) 65: 4892-4896

Campese C., Bitar D., Jarraud S., Maine C., Forey F., Etienne J., Desenclos J.C., Saura C., Che D. Progress in the surveillance and control of *Legionella* infection in France, 1998 – 2008. *Int. J. Infect. Dis.* (2010)

Cavalier-Smith T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (1993) 57: 953-994

Corsaro D., Pages G.S., Catalan V., Loret J.F., Greub G. Biodiversity of amoebas and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. *Int. J. Hyg. Environ. Health* (2010) 213: 158-166

Declerck P. Biofilms : the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.* (2010) 12: 557-566

De Jonckheere J.F. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* (1980) 39: 681-685

Doleans A., Aurell H., Reyrolle M., Ina G., Reney J., Andenesch F., Etienne J., Jarraud S. Clinical and Environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J. Clin. Microbiol.* (2004) 42: 458-460

Faulkner G., Berk S.G., Garduño E., Ortiz-Jimenez M.A., Garduño R.A. Passage through *Tetrahymena tropicalis* Triggers : a Rapid Morphological Differentiation in *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* (2008) 190: 7728-7738

Fields B.S. The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* (1996) 4: 286-290

- Fields B.S., Benson R.F., Besser R.E. Legionella and Legionnaires' Disease : 25 Years of Investigation. Clin. Microbiol. Rev. [2002] 15: 506-526
- Finlay B.J., Esteban G.F. Freshwater protozoa : biodiversity and ecological function. Biodiversity and Conservation. [1998] 7: 1163-1186
- Garduño E.F., Faulkner G., Ortiz-Jimenez M.A., Berk S.G., Garduño R.A. Interaction with the ciliate *Tetrahymena* sp. may predispose *Legionella pneumophila* to infect human cells. In "Legionella : state of the Art 30 years after its recognition" Eds N.P. Cianciotto, Y. Abu Kwaik, P.H. Edelstein, B.S. Fields, D.F. Geary, T.G. Harrison, C.A. Joseph, R.M. Ratcliff, J.E. Stout and M.S. Swanson. Washington. [2006] 297-300
- Girod J.C., Reichman R.C., Winn W.C., Klauke D.N., Vogt R.L., Dolin R. Pneumonic and nonpneumonic forms of legionellosis. The result of a common-source exposure to *Legionella pneumophila*. Arch. Intern. Med. [1982] 142: 545-547
- Griffin J.L. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. Science [1972] 178: 869-870
- Holden E.P., Winkler H.H., Wood D.O., Leinbach E.D. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba castellanii* Neff. Infect. Immun. [1984] 45: 18-24
- Joseph C.A., Ricketts K.D., et European Working Group for Legionella Infections, Respiratory Diseases Department Health Protection Agency Centre for Infections. Surveillance and outbreak reports - Legionnaires' disease in Europe 2007 - 2008. Eurosurveillance 15 (25-2-2010)
- Kuiper M.W., Wullings B.A., Akkermans A.D.L., Beumer R.R., Van der Kooij D. Intracellular Proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in Aquatic Biofilms Grown on Plasticized Polyvinyl Chloride. Appl. Environ. Microbiol. [2004] 70: 6826-6833
- Lynn D.H., Corliss J.O. in "Microscopic Anatomy of Invertebrates : Protozoa" Ed. Wiley-Liss New-York [1991]: 333-467
- Mody C.H., Paine R. III, Shahrabadi M.S., Simon R.S., Pearlman E., Eisenstein B.I., Toews G.B. Legionella replicates within rat alveolar epithelial cells. J. Infect. Dis. [1993] 167: 1138-1145
- Moritz M.M., Flemming H.C., Wingender J. Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. Int. J. Hyg. Environ. Health [2010] 213: 190-197
- Ohno A., Kato N., Sakamoto R., Kimura S. Yamaguchi K. Temperature-Dependent Parasitic Relationship between *Legionella pneumophila* and a Free-Living Amoeba [*Acanthamoeba castellanii*] Appl. Environ. Microbiol. [2008] 74: 4585-4588
- Pagnier I., Merchat M., La S.B. Potentially pathogenic amoeba-associated microorganisms in cooling towers and their control. Future Microbiol. [2009] 4: 615-629
- Philippe C., Blech M.F., Hartemann P. Multiplication intra-amibienne de *Legionella pneumophila* et rôle potentiel des amibes dans la transmission de la légionellose. Med. Mal. Infect. [2006] 36: 196-200
- Rodriguez-Zaragoza S. Ecology of free-living amoebae. Crit. Rev. Microbiol. [1994] 20: 225-241
- Rogers J. Dowsett A.B., Dennis P.J., Lee J.V., Keevil C.W. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. Appl. Environ. Microbiol. [1994] 60: 1585-1592
- Rowbotham T.J. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. J. Clin. Pathol. [1983] 36: 978-986
- Yu V.L., Plouffe J.F., Pastoris M.C., Stout J.E. Schousboe M., Widmer A., Summersill J., File T., Heath C.M., Paterson D.L., Cheresky A. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis : an international collaborative survey. J. Infect. Dis. [2002] 186: 127-128
- Pseudomonas aeruginosa et autres Pseudomonas**
- Adler K.B., Hendley D.D., Davis G.S. Bacteria associated with obstructive pulmonary disease elaborate extracellular products that stimulate mucin secretion by explants of guinea pigs airways. Am. J. Path. [1986] 125: 501-514
- Bajolet-Laudinat O., Girod-de Bentzmann S., Tournier J.M., Madoulet C., Plotkowski M.C., Chippaux C., Puchelle E. Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. Infect. Immun. [1994] 62: 4481-4487
- Baljer G., Barret J.T. Demonstration of enterotoxin-forming *Pseudomonas aeruginosa* strains in the intestinal ligature test in piglets. J. Vet. Med. [1979] 26: 740-747
- Beaudeau P., de Valk H., Vaillant V., Mouly D. Détection et investigation des épidémies d'infection liées à l'ingestion d'eau de distribution - Approche intégrée environnementale et sanitaire. Institut national de Veille Sanitaire [2007]
- Buck A.C., Cooke E.M. The fate of ingested *Pseudomonas aeruginosa* in normal persons. J. Med. Microbiol. [1969] 2: 521-525
- Chaidez C., Gerba C.P. Comparison of the microbiologic quality of point-of-use (POU)-treated water and tap water. Int. J. Environ. Health Res. [2004] 14: 253-260
- Dejli J., Chibani A., Zouhdi M., El Messoui M., Aloui M.A., El Yachoui M. Antibiorésistance de certains germes isolés dans les aliments en milieu hospitalier (CHU Avicenne, Rabat) Med. Mal. Infect. [2000] 30 (10): 661-664
- Eckmanns T., Oppert M., Martin M., Amorosa R., Zuschneid I., Frei U., Raden H., Weist K. An outbreak of hospital-acquired *Pseudomonas aeruginosa* infection caused by contaminated bottled water in intensive care units. Clin. Microbiol. Infect. [2008] 14: 454-458
- Exner M., Kramer A., Lajoie L., Gebel J., Engelhart S., Hartemann P. Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. Am. J. Infect. Control. [2005] 33 (5) suppl1: S26-40
- Gennari M., Dragotto F. A study of the incidence of different fluorescens *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. J. Appl. Bacteriol. [1992] 72: 281-288
- George S.E., Kohan M.J., Walsh D.B., Claxton L.D. Acute colonization study of polychlorinated bi-phenyl-degrading pseudomonads in the mouse intestinal tract : Comparison of single and multiples exposures. Environ Toxicol. Chem. [1989] 8: 123-131
- George S.E., Kohan M.J., Whitehouse D.A., Creason J.P., Kawanishi C.Y., Sherwood R.L., Claxton L.D. Distribution, clearance, and mortality of environmental pseudomonads in mice upon intranasal exposure. Appl. Environ. Microbiol. [1991] 57: 2420- 2425
- Hardalo C., Edberg S.C. *Pseudomonas aeruginosa* : Assessment of risk from drinking water. Crit. Rev. Microbiol. [1997] 23 (1) 47-75
- Hentges D.J., Stein A.J., Casey S.W. Que J.U. Protective role of intestinal flora against infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice : Influence of antibiotics on colonization resistance. Infect. Immun. [1985] 47: 118-122

- Iglewski B.H., Burns R.P., Gipson I.K. Pathogenesis of corneal damage from *Pseudomonas* exotoxin A. *Investigate Ophthalmology and Visual Science* (1977) 16: 73-76
- Koh A.Y., Priebe G.P., Pier G.B. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of gastrointestinal colonization and dissemination in neutropenia. *Infect. Immun.* (2005) 73: 2262-2272
- Long J., Zaborina O., Holbrook C., Zaborin A. Alverdy J. Depletion of intestinal phosphate after operative injury activates the virulence of *P. aeruginosa* causing lethal gut-derived sepsis. *Surgery* (2008) 144: 189-197
- Mena K.D., Gerba C.P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. In "Reviews of Environmental Contamination and Toxicology" (2009): 71-115
- Ministère de la Santé et des Solidarités. L'eau dans les établissements de santé - Guide technique (2005)
- Moritz M.M., Flemming H.C., Wingender J. Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *Int. J. Hyg. Environ. Health* (2010) 213: 190-197
- Percival S.L., Knapp J.S., Edyvean R.G.J., Wales D.S. Biofilms, mains water and stainless steel. *Water Research* (1998) 32: 2187-2201
- Phillips R.M., Six D.A., Dennis E.A., Ghosh P. In Vivo Phospholipase Activity of the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU and Protection of Mammalian Cells with Phospholipase A2 Inhibitors. *J. Biol. Chem.* (2003) 278: 41326-41332
- Rao T.S., Kesavamoorthy R., Babu Rao C., Nair K.V.K. Influence of flow on ordering characteristics of a bacterial biofilm. *Current Science* (1997) 73: 69-74
- Rapport Anses « Evaluation des risques sanitaires liés à l'exposition par ingestion de *Pseudomonades* dans les eaux destinées à la consommation humaine (hors eaux conditionnées) » Agence nationale de sécurité sanitaire - alimentation, environnement, travail - Octobre 2010
- Rusin P.A., Rose J.B., Haas C.N., Gerba C.P. Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Rev. Environ. Cont. Toxicol.* (1997) 152: 57-83
- Sarlangue J., Brissaud O., Labraze C. Aspects cliniques de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Ped.* (2006) 13 suppl 1.
- Soriano J.M., Rico H., Moltó J.C., Mañes J. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. *Int. J. Food Microbiol.* (2000) 58 (1-2): 123-128
- Vess R.S., Anderson R.L., Carr J.H., Bond W.W., Favero M.S. The colonisation of solid PVC surfaces and the acquisition of resistance to germicides by water microorganisms. *J. Appl. Bacteriol.* (1993) 74: 215-221
- WHO/OMS. Guidelines for Drinking-water Quality - Volume 1 Recommendations (2008) http://who.int/water_sanitation_health/dwg/gdwg3rev/en/index.html
- Xiao G., Daziel E., et al. MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol. Microbiol.* (2006) 62: 1689-1699
- Yoder J., Roberts V. et al. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking - United States, 2005 - 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report - CDC* (2008) 57: 39-62
- Zaborin A., Romanowski K., et al. Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (2009) 106: 6327-6332
- Zaborina O., Holbrook C., et al. Structure-function aspects of PstS in multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens* (2008) 4
- Les mycobactéries non tuberculeuses**
- Dubrou S., Macheras E., Welte B., Guidicelli L., Chignon E., Gaillard J.L., Heym B. Prévalence de mycobactéries non tuberculeuses dans les filières de traitement et les réseaux de distribution d'eau à Paris. In « Journées Information Eaux », Tome 2, 28 - 30 septembre 2010
- Runyon E.H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *The Medical clinics of North America* (1959) 43 (1): 273-90.
- La flore microbienne revivifiable**
- Burman N.P., Colbourne J.S. Techniques for the assessment of growth of microorganisms on plumbing materials used in contact with potable water-supplies. *J. Appl. Bacteriol.* (1977) 43: 137-144
- Galassi L. et al. Evaluation of the possible correlation between Heterotrophic Plate Count and presence of non tuberculous mycobacteria in drinking water. In "NSF International/World Health Organization Symposium on HPC Bacteria in Drinking Water" Geneva, Switzerland, April 22-24, 2002
- Leclerc H. Y a-t-il des infections opportunistes transmises par les eaux d'alimentation ? *J. Euro. Hydrol.* (2003) 34 : 11 - 44
- Schoenen D., Schöler H.F. *Trinkwasser und Werkstoffe : Praxisbeobachtungen und Untersuchungsverfahren.* Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1983
- Schubert R.H.W., Blum K.H. Standard plate count (HPC) and its relation to the occurrence of *P. aeruginosa*, *Aeromonas* sp. and endospores of aerobic bacilli in drinking water quality. In "NSF International/World Health Organization Symposium on HPC Bacteria in Drinking Water" Geneva, Switzerland, April 22-24, 2002
- Van Lieverloo J.H.M., Van der kooij D., Veenendaal G. National survey of invertebrates in drinking water distribution systems in the Netherlands. *Proc. Am. Water Works. Assoc.* « Water Quality Technology Conference » San Francisco, California, Nov. 6-10, 1994: 2605-2681
- Les Aeromonas**
- Edberg S.C., Allen M.J. Issues for microbial regulation : *Aeromonas* as a model. *Crit. Rev. Microbiol.* (2002),
- Havelaar A.H., Versteegh J.F.M., During M. The presence of *Aeromonas* in drinking water supplies in the Netherlands. *Zbl. Hyg.* (1990) 190: 236-256
- Janda J.M. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol. Rev.* (1991) 4: 397-410
- Krovacek K. et al. Isolation and virulence profiles of *Aeromonas* spp. from different municipal drinking water supplies in Sweden. *Food Microbiol.* (1992) 9: 215-222
- Leclerc H., Buttiaux R. Fréquence des *Aeromonas* dans les eaux d'alimentation. *Ann. Inst. Pasteur* (1962) 103 : 97 - 100
- Nichols G.L., Holt D., Said B. Identifying and examining information on emerging water borne pathogens. In "NSF International/World Health Organization Symposium on HPC Bacteria in Drinking Water" Geneva, Switzerland, April 22-24, 2002

Schubert R.H.W. Aeromonads and their significance as potential pathogens in water. *J. Appl. Bacteriol.* (1991) 70: 131-135

Stelma G.M., Johson C.H., Spaulding P. Evidence for the direct involvement of beta-hemolysin in *Aeromonas hydrophila* enteropathogenicity. *Curr. Microbiol.* (1986) 14: 71-77

WHO/OMS. Guidelines for Drinking-water Quality - Volume 1 Recommendations (2008) http://who.int/water_sanitation_health/dwg/gdwg3rev/en/index.html

Bactéries coliformes

Baylis J.R. Bacterial aftergrowths in water distributions systems. *Water Works Sewerage* (1930) 77 (10) 335-338

Burman N.P., Colbourne J.S. Techniques for the assessment of growth of microorganisms on plumbing materials used in contact with potable water-supplies. *J. Appl. Bacteriol.* (1977) 43: 137-144

Camper A.K., Burr M., Ellis B., Butterfield P., Abernathy C. Development and structure of drinking water biofilms and techniques for their study. *J. Appl. Microbiol. Symp.* (1999) Supp. 85

Ellgas W.M., Lee R. Reservoir coating can support bacterial growth. *J. AWWA* (1980) 693-695

Schoenen D., Schöler H.F. *Trinkwasser und Werkstoffe : Praxisbeobachtungen und Untersuchungsverfahren.* Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1983

Seidler R.J., Morrow J.E., Bagley S.T. Klebsiella in drinking water emanating from redwood tanks. *Appl. Environ. Microbiol.* (1997) 33: 893-900

Les différents états physiologiques des bactéries

Allegra S., Berger F., Berthelot P., Grattard F., Pozzetto B., Riffard S. Use a Flow Cytometry To Monitor Legionella Viability. *Appl. Environ. Microbiol.* (2008) 74: 7813-7816

Bej A.K., Mahubani M.H., Atlas R.M. Detection of viable Legionella pneumophila in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl. Environ. Microbiol.* (1991) 57: 597-600

Delgado-Viscogliosi P., Simonart T., Parent V., Marchand G., et al. Rapid Method for Enumeration of Viable Legionella pneumophila and other Legionella spp. in Water. *Appl. Environ. Microbiol.* (2005) 71: 4086-4096

Delgado-Viscogliosi P., Solignac L., Delattre J.M. Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable Legionella pneumophila cells in environmental water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* (2009) 75: 3502-3512

Dusserre E., Ginevra C., Hallier-Soulier S., Vandenesch F., Festoc G., Etienne J., Jarraud S., Molmeret M. A PCR-Based Method for Monitoring Legionella pneumophila in Water Samples Detects Viable but Noncultivable Legionellae That Can Recover Their Cultivability. *Appl. Environ. Microbiol.* (2008) 74: 4817-4824

Garcia M.T., Jones S., Pelaz C., Millar R.D., Kwaik Y.A. Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable Legionella pneumophila after disinfection. *Environ. Microbiol.* (2007) 9: 1267-1277

Hwang M.G., Katamaya H., Ohgaki S. Effect of Intracellular Resuscitation of Legionella pneumophila in Acanthamoeba polyphaga Cells on the Antimicrobial Properties of Silver and Copper. *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40: 7434-7439

Oliver J.D. The public health significance of viable but nonculturable bacteria. In "Nonculturable microorganisms in the environment" Ed. R.R. Colwell and D.J. Grimes. ASM Press, Washington, D.C. (2000) 277-300

Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *Federation of European Microbiological Societies* (2009) 1-11

Steinert M., Emody L., Amann R., Hacker J. Resuscitation of viable but nonculturable Legionella pneumophila Philadelphia JR32 by Acanthamoeba castellanii. *Appl. Environ. Microbiol.* (1997) 63: 2047-2053

Steinert M., Ockert G., Lã C., Hacker J. Regrowth of Legionella pneumophila in a heat-disinfected plumbing system. *Int. J. Med. Microbiol.* (1998) 288: 331-342

Thomas V., Bouchez T., Nicolas V., Robert S., Loret J.F., Lã Y. Amoebae in domestic water systems : resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence. *J. Appl. Microbiol.* (2004) 97: 950-963

LES MÉTHODES DE LUTTE CONTRE LA CONTAMINATION DES RÉSEAUX INTÉRIEURS

Les textes généraux

Décret n°73-138 du 12 février 1973 portant application de la loi du 1^{er} août 1905 sur la répression des fraudes en ce qui concerne les produits chimiques dans l'alimentation humaine et les matériaux et objets au contact des denrées, produits et boissons destinés à l'alimentation de l'homme et des animaux ainsi que les procédés et produits utilisés pour le nettoyage de ces matériaux et objets

Décret n°2007-49 du 11 janvier 2007 relatif à la sécurité sanitaire des eaux destinées à la consommation humaine Arrêté du 29 mai 1997 relatif aux matériaux et objets utilisés dans les installations fixes de production, de traitement et de distribution d'eau destinée à la consommation humaine

Arrêté du 8 septembre 1999 pris pour l'application de l'article 11 du décret no 73-138 du 12 février 1973 modifié portant application de la loi du 1^{er} août 1905 sur les fraudes et falsifications en ce qui concerne les procédés et les produits utilisés pour le nettoyage des matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées, produits et boissons pour l'alimentation de l'homme et des animaux

Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique

Circulaire du 7 mai 1990 relative aux produits et procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine Circulaire DSG VS 4 n° 99-360 du 21 juin 1999 relative aux appareils individuels de traitement des eaux destinées à la consommation humaine au robinet Circulaire DG 5/VS 4 n° 2000-166 du 28 mars 2000 relative aux produits de procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine

Centre Scientifique et Technique du Bâtiment. Réseaux d'eau destinée à la consommation humaine à l'intérieur des bâtiments - Partie 1 : Guide technique de conception et de mise en œuvre (2003), 88 pages.

La prévention de la légionellose

Arrêté du 30 novembre 2005 modifiant l'arrêté du 23 juin 1978 relatif aux installations fixes destinées au chauffage et à l'alimentation en eau chaude sanitaire des bâtiments d'habitation, des locaux de travail ou des locaux recevant du public

Arrêté du 1^{er} février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire
 Circulaire DGS/SD7A n° 2002-273 du 2 mai 2002 relative à la diffusion du rapport du conseil supérieur d'hygiène publique de France relatif à la gestion du risque lié aux légionelles

Circulaire interministérielle DGS/SD7A/DSC/DGUHC/DGE/DPPR n° 2006-126 du 3 avril 2007 relative à la mise en œuvre de l'arrêté du 30 novembre 2005 modifiant l'arrêté du 23 juin 1978 relatif aux installations fixes destinées au chauffage et à l'alimentation en eau chaude sanitaire des bâtiments d'habitation, des locaux de travail ou des locaux recevant du public

Circulaire n°DGS/EA4/2010/448 du 21 décembre 2010 relative aux missions des Agences régionales de santé dans la mise en œuvre de l'arrêté du 1^{er} février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire.

Guide technique du CSTB - Ministère de la santé
 « Maîtrise du risque de développement des légionelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire »

Les établissements de santé

Circulaire DGS/DH/AFSSAPS n°311 du 7 juin 2000 relative aux spécifications techniques et à la sécurité sanitaire de la pratique de l'hémodilution et de l'hémodiafiltration « en ligne » dans les établissements de santé

Circulaire DGS/DH/AFSSAPS n°2000/337 du 20 juin 2000 relative à la diffusion d'un guide pour la production d'eau pour hémodialyse des patients insuffisants rénaux

Circulaire DGS/DHOS n°2002-243 du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé

Circulaire DHOS/DGS n°2005-417 du 9 septembre 2005
 « Guide technique de l'eau dans les établissements de santé »

Groupe Eau - Santé « Eaux des établissements de santé » :
 • qualité de l'eau des réseaux intérieurs (décembre 2000)
 • qualité de l'eau aux points d'usage (mai 2003)
 • lexique pratique (septembre 2006)

Les établissements pour personnes âgées

Circulaire DGS/SD7A-DHOS/E4-DGAS/SD2 n°2005-493 du 28 octobre 2005 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements sociaux et médico-sociaux d'hébergement pour personnes âgées.

Groupe Eau - Santé « Eau des établissements pour personnes âgées - Maîtrise des risques sanitaires » (mai 2008)

Les établissements thermaux

Arrêté du 19 juin 2000 modifiant l'arrêté du 14 octobre 1937 modifié relatif au contrôle des sources d'eaux minérales
 Circulaire DGS/VS 4 N° 2000-336 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux

La sécurité sanitaire de l'eau dans les bâtiments

Anaissie E.J., Penzak S.R., Dignagni C. The hospital water supply as a source of nosocomial infections. Arch. Internal Med. (2002) 162: 1483-1492

Bartram J.A., Cotruvo A., Exner M., Fricker C., Glasmacher A. Heterotrophic plate counts and drinking-water safety : the significance of HPCs for water quality and human health Organisation Mondiale de la Santé, Genève 2003

Bartram J.A., Cotruvo A., Dufour A., Rees G., Pedely S. Eds. Pathogenic mycobacteria in water : a guide to public health consequences, monitoring and management Organisation Mondiale de la Santé, Genève 2004

Bartram J.A., Chartier Y., Lee J.V., Pond K., Surman-Lee S. Eds. Legionella and the prevention of legionellosis. Organisation Mondiale de la Santé, Genève 2007

Cunliffe D, Bartram J., Briand E., Chartier Y., Colbourne J., Drury D., Lee J., Schaefer B., Surman-Lee S. Eds. Sécurité sanitaire de l'eau dans les bâtiments - Organisation Mondiale de la Santé juillet 2011/Water safety in buildings - World Health Organization March 2011.

Hutton G., Haller L. Evaluation of the costs and benefits of water and sanitation improvements at the global level. Organisation Mondiale de la Santé Genève 2004 [http://www.who.int/water_sanitation_health/wsh0404.pdf]

Joseph C. The risk of suffering from Legionnaires' disease whilst abroad. J. Royal Soc. Health (2002) 122: 6-7

WHO/WPC. Health aspects of plumbing (2006)

OMS/WHO Guidelines for safe recreational water environments volume 2 : swimming pools and similar environments (2006a)
 OMS/WHO. Directives de qualité pour l'eau de boisson/ Guidelines for Drinking Water Safety (2008)

LES MÉTHODES DE TRAITEMENT DE LA CONTAMINATION DES RÉSEAUX INTÉRIEURS

Les procédés et produits de nettoyage et de désinfection

Arrêté du 8 septembre 1999 pris pour l'application de l'article 11 du décret n°73-138 du 12 février 1973 modifié portant application de la loi du 1^{er} août 1905 sur les fraudes et falsifications en ce qui concerne les procédés et les produits utilisés pour le nettoyage des matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées, produits et boissons pour l'alimentation de l'homme et des animaux

Circulaire du 7 mai 1990 relative aux produits et procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine

Circulaire DG 5/VS 4 n°2000-166 du 28 mars 2000 relative aux produits de procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine

Circulaire n° DGS/EA4/2010/448 du 21 décembre 2010 relative aux missions des Agences régionales de santé dans la mise en œuvre de l'arrêté du 1^{er} février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire.

DeBeer D., Srinivasan R., Stewart P.S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilm during disinfection. Appl. Environ. Microbiol. (1994) 60: 4339

Décret n°73-138 du 12 février 1973 portant application de la loi du 1^{er} août 1905 sur la répression des fraudes en ce qui concerne les produits chimiques dans l'alimentation humaine et les matériaux et objets au contact des denrées, produits et boissons destinés à l'alimentation de l'homme et des animaux ainsi que les procédés et produits utilisés pour le nettoyage de ces matériaux et objets

DTU 60-1. Plomberie sanitaire à usage d'habitation

Farhat M., Trouilhé M.-C., Briand E., Moletta-Denat M., Robine E., Frère J. Development of a pilot-scale 1 for Legionella elimination in biofilm in hot water network : heat shock treatment evaluation. *J. Appl. Microbiol.* [2010] 108 (3) 1073-1082 .

Kilvington S., Price J. Survival of Legionella pneumophila within cysts of Acanthamoeba polyphaga following chlorine exposure. *J. Appl. Bacteriol.* [1990] 68: 519-525

Kim B.R., Anderson J.E., Mueller S.A., Gaines W.A., Kendall A.M. Literature review : efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems. *Water Res.* [2002] 36: 4433-4444

Ministère de la Santé et des Solidarités. L'eau dans les établissements de santé - Guide technique (2005)

Mouchtouri V., Velonakis E., Hadjichristodoulou C. Thermal disinfection of hotels, hospitals, and athletic venues hot water distribution systems contaminated by Legionella species. *Am. J. Infect. Cont.* [2007] 35 (9): 623-627

Pecastaings S. Apport de modèles de biofilms à Pseudomonas aeruginosa et Legionella pneumophila à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse Doctorat, Université de Toulouse, novembre 2010

Thomas V., Bouchez T., Nicolas V., Robert S., Loret J.F., Levi Y. Amoebae in domestic water systems : resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence. *J. Appl. Microbiol.* [2004] 97: 950-963

Les procédés et produits de traitement de l'eau

Arbeitskreis Trinkwasserinstallation & Hygiene
Hygiène de l'eau dans les installations résidentielles -
Constatations des experts allemands.
L'entreprise novembre 2010 : 44 - 47

Arrêté du 30 novembre 2005 modifiant l'arrêté du 23 juin 1978 relatif aux installations fixes destinées au chauffage et à l'alimentation en eau chaude sanitaire des bâtiments d'habitation, des locaux de travail ou des locaux recevant du public

Chord F., Fascia P., Mallaval F.O., Roesch L., Fuentes P., Grattard F., Cornillon J., Berthelot P. Polyéthylène réticulé et dioxyde de chlore : un danger pour les réseaux d'eau des établissements de santé ? In « XXI^e Congrès national de la Société Française d'Hygiène Hospitalière » [2010] : 68
Circulaire DGS/PGE/1D n°52 du 19 janvier 1987 relative à la désinfection des eaux destinées à la consommation humaine par les rayons ultraviolets

Circulaire du 7 mai 1990 relative aux produits et procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine

Circulaire DG 5/VS 4 n°2000-166 du 28 mars 2000 relative aux produits de procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine

Circulaire interministérielle n°DGS/SD7A/DSC/DGUHC/DGE/DPPR/126 du 3 avril 2007 relative à la mise en œuvre de l'arrêté du 30 novembre 2005 modifiant l'arrêté du 23 juin 1978 relatif aux installations fixes destinées au chauffage et à l'alimentation en eau chaude sanitaire des bâtiments d'habitation, des locaux de travail ou des locaux recevant du public.

Ministère de la Santé et des Solidarités. L'eau dans les établissements de santé - Guide technique (2005)

Squinazi F., Pellet X. La sécurisation microbiologique de l'eau à son point d'usage : l'apport de la technologie BEHRING™ HygièneS (2010) XVIII (3) : 235-238

Squinazi F., Vandermeulen K., Pellet X. Etude d'une fontaine réfrigérante sécurisée dans 15 établissements de santé. *HygièneS* (2011) XIX (4) : 221-226



Biofilm & Matériaux

des réseaux intérieurs de distribution d'eau

EDITION 2013

Docteur Fabien SQUINAZI
fabien.squinazi@gmail.com